

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Prevalência, alterações clínicas e histológicas cutâneas
associadas à infecção por *Trypanosoma caninum* e
Leishmania chagasi em cães domésticos**

HERICA MAKINO

Cuiabá, Mato Grosso, Brasil

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

**Prevalência, alterações clínicas e histológicas cutâneas
associadas à infecção por *Trypanosoma caninum* e
Leishmania chagasi em cães domésticos**

Herica Makino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

ORIENTADORA: Professora Doutora Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida

Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

M235p MAKINO, HERICA.

Prevalência, alterações clínicas e histológicas cutâneas associadas à infecção por Trypanosoma caninum e Leishmania chagasi em cães domésticos / HERICA MAKINO. -- 2017

67 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida.

Co-orientadora: Valéria Dutra.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2017.

Inclui bibliografia.

1. dermatopatias. 2. Leishmania chagasi. 3. histopatologia. 4. Trypanosoma caninum. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

Herica Makino

**Prevalência, alterações clínicas e histológicas cutâneas
associadas à infecção por *Trypanosoma caninum* e
Leishmania chagasi em cães domésticos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

BANCA EXAMINADORA

Aprovada: 23 de fevereiro de 2017

Prof^a. Dra. Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida
Presidente da Banca – UFMT

Dra. Mariana de Medeiros Torres
Titular Externo

Prof^a. Dra. Valéria Régia Franco Sousa
Titular da Casa - UFMT

Prof^a. Dra. Edson Moleta Colodel

Suplente da Casa - UFMT

Dedico este trabalho ao meu pai Kinji Makino (*in memoriam*) que estaria muito feliz e orgulhoso de mim. Não existem palavras capazes de expressar minha admiração, minha gratidão, minha saudade e meu amor por você. Te amarei para sempre

Agradecimentos

A Deus, por me permitir o ingresso no Mestrado em 2015 e sua conclusão em 2017.

A minha mãe Eunice Makino por não medir esforços para que eu pudesse atingir meus objetivos; pelo apoio financeiro e emocional, principalmente nos momentos de estresse e desânimo e por sempre acreditar em mim.

Ao meu irmão Rogério Makino, por todo apoio, amizade e incentivo; você sempre foi meu exemplo de determinação e com certeza não conseguiria chegar até aqui sem me espelhar em você; sinto muito por nos últimos anos não ter sido tão presente, mas serei eternamente grata a você e a nossa mãe por terem cuidado tão bem do nosso Totchian.

Ao meu esposo e melhor amigo Amilcar Baggio, que há mais de nove anos é uma pessoa tão amada e especial; obrigada por todo amor, companheirismo, conforto nos momentos difíceis e pelo apoio em todas as decisões importantes da minha vida.

A minha orientadora Arleana de Almeida pelo exemplo de profissional ética, por toda aprendizagem adquirida nos últimos anos, por ter se mostrado sempre tão solícita e disposta a ajudar em tudo que fosse preciso e por incentivar o estudo sempre.

A professora Valéria Regia Franco Sousa por todos os conselhos, orientações e por tudo que me ensinou em todos os anos que estive no setor de Clínica Médica.

Aos professores Valéria Dutra, Luciano Nakazato e Edson Moleta Colodel pelo auxílio e presteza no esclarecimento de dúvidas durante todo o período do projeto.

A todos os amigos que convivi durante o mestrado principalmente: Amanda, Álvaro, Mariana, Naiani, Felipe, Mayara, Karoline, Tammy, Thalita, Zamar, Thayza, Natália, Clara, Janaina e Kalinne.

A todos os animais que fizeram parte do estudo, sem vocês nada seria possível.

A todos os meus animais que já tive e tenho Tweety, Galo, Chick, China, Nina e Malhado.

A todos que colaboraram de alguma forma; muito obrigada!

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
pela concessão de bolsa de mestrado.

Resumo

Leishmania chagasi é um dos principais tripanosomatídeos causadores de dermatopatia em cães, porém o isolamento de *Trypanosoma caninum* em pele de cães tem sido detectado em diversas regiões do Brasil. O objetivo desse trabalho foi investigar a prevalência de *T. caninum* em cães com intuito de averiguar possíveis alterações de pele, clínicas e histológicas, associadas à infecção por este agente e comparar à infecção por *L. chagasi*. Dos 150 cães pesquisados, em três (2%) foi detectada a infecção por *T. caninum* e em 15 (10%) infecção por *L. chagasi*. Não foi observada associação estatisticamente significativa ($p>0.05$) quanto à raça, sexo, idade e presença de dermatopatias. Alterações dermatológicas foram observadas em um (4.8%) e 12 (57.1%) cães infectados por *T. caninum* e *L. chagasi*, respectivamente. Pela análise histopatológica de pele dos cães infectados por *T. caninum*, havia dois cães sem dermatopatia clínica. Nestes cães o padrão foi infiltrado perivascular com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário leve e no cão que tinha alterações dermatológicas clínicas notou-se co-infecção por fungos do gênero *Microsporum* sp e *Trichophyton* sp associada a acantose, hiperqueratose ortoqueratótica epidermal e a presença de melonomacrófagos. Em relação à análise histológica da pele dos cães infectados por *L. chagasi* os achados mais observados foram infiltrado inflamatório crônico granulomatoso. Estruturas morfolologicamente compatíveis com amastigotas de *Leishmania* sp foram observadas em um cão. Deduz-se com base nos dados obtidos que o *T. caninum* não causa reação inflamatória cutânea significativa que possa ser perceptível clinicamente, porém mais estudos são necessários para melhor caracterizar condições de saúde sistêmica de cães infectados por esse agente.

Palavras-chave: dermatopatias, *Leishmania chagasi*, histopatologia, *Trypanosoma caninum*

Abstract

Leishmania chagasi is one of the main trypanosomatids that cause dermatopathy in dogs, but *Trypanosoma caninum* has been isolated in dog skin in several regions of Brazil. The objective of this study was to investigate the prevalence of *T. caninum* in dogs in order to investigate possible clinical and histological skin changes associated with infections by this agent and to compare the findings to those obtained with *L. chagasi* infection. Of the 150 dogs surveyed, a *T. caninum* infection was detected in three (2%) dogs and an *L. chagasi* infection in 15. There was no statistically significant association ($p > 0.05$) with race, sex, age, and the presence of dermatopathies. Dermatological changes were observed in one (4.8%) and 12 (57.1%) dogs infected by *T. caninum* and *L. chagasi*, respectively. In the histopathological analysis of the skin of dogs infected with *T. caninum*, two dogs did not show clinical dermatopathy. These dogs showed a perivascular infiltrate with a mild lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate. The dog with clinical dermatological alterations showed a co-infection with fungi of the genus *Microsporum* sp. and *Trichophyton* sp., which was associated with acanthosis, epidermal orthokeratotic hyperkeratosis, and the presence of melanomacrophages. The most common finding in the skin analysis of dogs infected with *L. chagasi* was chronic granulomatous inflammatory infiltrate. One dog was found to have a structure that was morphologically consistent with amastigotes of *Leishmania* sp. The presence of nonspecific changes found in the histology of dogs with and without dermatopathies leads us to infer that *T. caninum* may not induce a cutaneous inflammatory reaction; however, more studies are necessary to better characterize the clinical and histological changes induced by this agent.

Keywords: dermatopathies, *Leishmania chagasi*, histopathology, *Trypanosoma caninum*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Positividade para <i>Trypanosoma caninum</i> e <i>Leishmania chagasi</i> nas amostras de sangue e pele na análise molecular utilizando os alvos 18S rDNA e <i>Leishmania</i> kDNA.....	27
Tabela 2. Análise univariada e multivariada dos fatores associados a infecção por <i>Trypanosoma caninum</i> e <i>Leishmania chagasi</i> nos 150 cães pesquisados.....	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomicroscopia da derme de um cão com infecção por *T. caninum* apresentando infiltrado inflamatório perivascular linfoplasmocitário. Aumento de 40X.....30
- Figura 2. Fotomicroscopia da derme de um cão com infecção por *L. chagasi* com presença de infiltrado inflamatório perivascular e perifolicular linfohistiofoplasmocitário e amastigotas de *Leishmania* sp , aumento de 60X.....31

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	Revisão de Literatura	14
2.1.	Dermatopatias	15
2.2.	Tripanossomatídeos	16
2.2.1.	<i>Trypanosoma caninum</i>	18
2.2.2.	Diagnóstico da infecção por <i>Trypanosoma caninum</i>	20
2.2.3.	<i>Leishmania chagasi</i>	20
2.2.4.	Diagnóstico da Leishmaniose visceral canina.....	22
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1.	Cães.....	23
3.2.	Análise Clínica – Dermatológica e Exames Complementares	24
3.3.	Deteção da Infecção por <i>Trypanosoma caninum</i> e <i>Leishmania chagasi</i>	24
3.4.	Isolamento parasitário em meio de cultura.....	25
3.5.	Extração de DNA, Reação em cadeia pela Polimerase (PCR) e Sequenciamento	25
3.6.	Análise Histológica.....	26
3.7.	Análise Estatística	26
4.	RESULTADOS	27
5.	DISCUSSÃO	31
6.	CONCLUSÃO	33
7.	REFERÊNCIAS.....	34
8.	APÊNDICE.....	47
8.2.	Artigo submetido para Revista Veterinary Parasitology	47
8.3.	Ficha de avaliação dos pacientes	67
8.4.	Avaliação Capes da Revista Veterinary Parasitology e Comprovante de Submissão do Artigo.....	69

1. INTRODUÇÃO

As alterações dermatológicas são de grande importância na clínica de pequenos animais, representando cerca de 30 a 40% dos casos atendidos na clínica médica (MACHICOTE; YOTTI, 2005). Segundo Scott et al. (2001), essa alta prevalência ocorre pelo fato da pele refletir processos patológicos que são primários ou compartilhados com outros tecidos. Em decorrência da diversidade de etiologias, uma anamnese detalhada, um exame físico minucioso e exames complementares são importantes para estabelecer diagnóstico definitivo (CONCEIÇÃO et al., 2004).

Em cães, as alterações cutâneas podem ter causas diversas, destacando as de origem bacterianas, imunopáticas e endócrinas (NAGATA; SAKAI, 1999). Entretanto, no Brasil, as infecções parasitárias também estão entre as mais frequentes e assumem um papel de extrema importância tanto por sua magnitude quanto pelo potencial zoonótico inerente a algumas dessas ectoparasitoses (CARDOSO et al., 2011; GASPARETTO et al., 2013).

As doenças parasitárias da pele podem ser causadas por parasitos nematódeos, artrópodes e protozoários (TORRES et al., 2004). Nesse grupo, os protozoários da Família Trypanosomatidae, principalmente do gênero *Leishmania* são incriminados como importantes causadoras de dermatopatias em cães residentes em áreas endêmicas no Brasil (GASPARETTO et al., 2013).

A leishmaniose visceral canina é uma doença zoonótica, crônica e potencialmente fatal causada pela *Leishmania chagasi* (syn. *L. infantum*) (BANETH et al., 2008). O cão doméstico é considerado principal reservatório e importante na manutenção e dispersão da doença, uma vez que apresenta alto parasitismo cutâneo, facilitando a infecção de vetores e, conseqüentemente, a transmissão para a população canina e humana (SOARES et al., 2011; DE QUEIROZ et al., 2011; WHO, 2016).

O quadro clínico da leishmaniose visceral canina geralmente é multifacetado (BANETH et al., 2008) e pode se manifestar de forma assintomática ou com envolvimento sistêmico. Apesar de o parasito apresentar natureza viscerotrópica (SILVA, 2007), as alterações cutâneas estão comumente presentes, podendo representar cerca de 70% das alterações clínicas apresentadas pelos cães (MOREIRA et al., 2016). As principais alterações cutâneas incluem alopecia, onicogribose, descamação, lesões ulcerativas, hiperqueratose, hipotricose e

presença de crostas localizadas ou generalizadas (SALZO, 2008; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

O gênero *Trypanosoma* compõe outro gênero de importância da família Trypanosomatidae em Medicina Veterinária (UMEZAWA et al., 2009), tendo espécies descritas em todo o mundo (HOARE, 1972). Até o momento, não há descrição de alterações dermatológicas associadas à infecção pelos parasitos deste gênero. No entanto, em 2009, Madeira e colaboradores descreveram uma nova espécie de *Trypanosoma* parasitando a pele de um cão co-infectado com *Leishmania braziliensis* na cidade do Rio de Janeiro, denominando-o *Trypanosoma caninum*. Desde então este parasito vem sendo isolado de cães em diferentes regiões do Brasil como Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Piauí (BARROS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Ainda pouco se sabe sobre o ciclo de desenvolvimento, tropismo e patogenicidade deste parasito. No entanto, esse agente tem mostrado características biológicas intrigantes, pois, além de não infectar triatomíneos e apresentar isolamento exclusivo sobre a pele, característica incomum do gênero *Trypanosoma*, pode também ser observada a presença de formas livres de epimastigotas sem flagelo em culturas axênicas (MADEIRA et al., 2009).

Um dos pontos que tem chamado atenção é o fato do *T. caninum* compartilhar o mesmo reservatório da *L. chagasi*, o que coloca esse parasito em evidência para vários aspectos de saúde pública, especialmente o risco de diagnóstico errôneo de leishmaniose visceral canina em áreas onde *L. chagasi* e *T. caninum* estão presentes (ALMEIDA et al., 2011; ALVES et al., 2012).

Aspectos relacionados à infectividade e à patogenicidade do *T. caninum* ainda são escassos. Trabalho realizado por Alves et al. (2012) demonstrou que *T. caninum* é pouco imunogênico para cães, porém é capaz de estimular a produção de anticorpos específicos. Madeira et al. (2014) estudando 14 cães naturalmente infectados confirmaram a detecção do parasito estritamente em pele ao testar diferentes sítios por métodos moleculares e isolamento em cultura, além de infecção assintomática, sem sinais clínicos específicos, e baixa parasitemia.

Desta forma, a realização dessa pesquisa teve por objetivo investigar a prevalência de *T. caninum* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT) com intuito de averiguar

possíveis alterações dermatológicas e histológicas associadas à infecção por este agente e comparar à infecção por *L. chagasi*.

2. Revisão de Literatura

2.1. Dermatopatias

A pele é um órgão autorrenovável que recobre toda a superfície do corpo e separa-o do mundo exterior com o qual se conecta de forma dinâmica (BREITKREUTZ et al., 2009). Ela fornece proteção física, proteção contra a desidratação, auxilia na regulação da temperatura, atua como órgão sensorial (sentido do tato), possui função metabólica (síntese de substância como a vitamina D) e imunitária além de ser uma via alternativa para a administração de medicamentos de forma minimamente invasiva por ser facilmente acessível (SHAHZAD et al., 2013; SCHARSCHMIDT e FISCHBACH, 2013; BELKAID e SEGRE, 2014; GRICE, 2015).

Devido à exposição contínua a agressões externas como radiação solar, estímulos mecânicos, mudanças climáticas e/ou danos químicos e biológicos (ELIAS et al., 2003), a pele pode apresentar degenerações, alterações metabólicas, malformações, disfunções e inflamações (SAMPAIO et al., 2000).

A dermatologia é considerada uma das áreas de grande importância na clínica médica veterinária (DE ANDRADE BRAGA et al., 2010) tanto no que se refere a prática clínica como também em estudos epidemiológicos (CAMPBELL, 2004). As afecções do sistema tegumentar representam cerca de 30 a 40% dos casos atendidos na clínica médica (MACHICOTE; YOTTI, 2005). Segundo Scott et al. (2001) essa alta prevalência ocorre pelo fato da pele poder refletir processos patológicos primários ou compartilhados com outros tecidos.

A diversidade de etiologias, a similaridade de sintomatologia clínica das dermatopatias, a possibilidade de várias doenças dermatológicas ocorrerem juntas requerem anamnese detalhada e exame físico minucioso (CARDOSO et al., 2013). Além disso, segundo Metz et al. (2010) os sinais dermatológicos podem se apresentar bastante variados dependendo da doença, sendo mais comumente observados alopecia, descamação e prurido.

Entre as doenças de pele mais frequentemente diagnosticadas encontram-se as de origem bacterianas, imunopáticas, endócrinas e parasitárias (NAGATA; SAKAI, 1999; SOUZA et al., 2009b; KHOSHNEGAH et al., 2013). Destas, as infecções parasitárias por *Sarcoptes scabiei*, *Demodex canis* e *Leishmania chagasi* são incriminadas como as principais espécies causadoras das dermatites parasitárias em cães (AUJLA et al., 2000; ALMEIDA et al., 2009; RUSSEL et al., 2013). Infecções por *Otodectes cynotis* e *Notoedres cati* podem ocorrer mais raramente em caninos e felinos (NEUWALD et al., 2004). Algumas dessas são frequentemente encontradas no Brasil e assumem um papel de extrema importância tanto por sua magnitude quanto pelo potencial zoonótico (CARDOSO et al., 2011; GASPARETTO et al., 2013).

Apesar de sua recente descrição e do pouco conhecimento sobre os aspectos relacionados à infectividade e patogenicidade, o *Trypanosoma caninum* tem sido encontrado parasitando a pele de cães domésticos, sem aparentemente induzir alterações dermatológicas (BARROS et al., 2012; MADEIRA et al., 2014).

O diagnóstico das afecções de pele geralmente é realizado com base na observação dos sinais clínicos e exames laboratoriais específicos (GARCIA et al., 2005), que incluem o exame parasitológico da pele, tricograma, exame citológico, cultura fúngica e bacteriana e exame histopatológico (CONCEIÇÃO et al., 2004; MENDELSON et al., 2006).

O exame parasitológico da pele é um teste laboratorial frequentemente utilizado tanto pela simplicidade como pelo baixo custo (WILKINSON e HARVEY, 1996; MUELLER, 2000). Pode ser realizado pelo método de raspado cutâneo ou por *imprint* com a fita de acetato e deve ser realizado sempre que houver suspeita de dermatopatia parasitária (HNILICA, 2011; PEREIRA et al., 2012; PEREIRA et al., 2015). A sensibilidade desses testes é considerada alta (PEREIRA et al., 2012), mas depende da qualidade da amostragem, espécie do parasito e método de coleta (SCOTT et al., 2001).

O cultivo fúngico é o teste diagnóstico considerado mais confiável e mais utilizado para a detecção de fungos (MATTEI et al., 2014). Há vários meios de cultura disponíveis para o isolamento fúngico. O Agar sabouraud dextrose suplementado com cicloheximida, adicionado ou não com cloranfenicol ou penicilina-gentamicina, é frequentemente recomendado (CHERMETE et al., 2008). O cultivo em meios seletivos como DTM (*Dermatophyte Test Medium*), Biggy e Agar

sabouraud glicose, tem sido amplamente utilizados na Medicina Humana e também já se mostrou efetivo para o diagnóstico rápido e preciso de dermatofitoses em felinos e caninos (KAUFMANN et al., 2016).

O diagnóstico de dermatofitoses também é possível por meio do exame microscópico direto de pelos, que permite um diagnóstico rápido e de fácil execução por meio da visualização de estruturas fúngicas (ROBERT e PIHET, 2008) e pela técnica de clarificação dos pelos com hidróxido de potássio (KOH) e o dimetilssulfóxido (DMSO) (SIDRIM e ROCHA, 2004).

O tricograma consiste na observação direta do pelo ao microscópio, permitindo a visualização de toda a sua estrutura (ARGÜERO et al., 2008). É uma técnica auxiliar de diagnóstico, não invasiva, rápida e barata (SCOTT et al., 2001), utilizada para procurar evidências de prurido, infecções fúngicas, alterações da pigmentação e avaliar o crescimento do pelo (HNILICA, 2011).

O exame histopatológico é considerado um dos métodos diagnósticos mais importantes em dermatologia veterinária e sua realização é indicada em qualquer situação de dúvida, terapêutica ou diagnóstica (SOUZA et al., 2009a; WERNER, 2009). Esse exame permite a visualização morfológica de tecidos e padrões histológicos (AFFOLTER et al., 2016) e mesmo que não seja suficiente para o estabelecimento do diagnóstico definitivo de uma determinada dermatopatia, a técnica permite a classificação de doenças e pode orientar o clínico veterinário para um determinado grupo de alterações (WERNER, 2008), além de ser um excelente auxiliar no diagnóstico diferencial (CONCEIÇÃO et al., 2004).

2.2. Tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos são parasitos uniflagelados pertencentes ao subfilo Mastigophora, filo Sarcomastigophora, classe Kinetoplastidae, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae que tem como principal característica o flagelo e o cinetoplasto (DE SOUZA et al., 2000). Apresentam ampla distribuição geográfica e diversidade de hospedeiros, sendo algumas espécies agentes etiológicos de doenças zoonóticas de importância veterinária (BARTA e DESSER, 1984; HAAG et al., 1998; LUKES et al., 2014).

A maioria das espécies desenvolve-se em hospedeiros vertebrados e invertebrados hematófagos que atuam respectivamente como reservatórios e

vetores. Tripanosomas infectam vertebrados de todas as classes (mamíferos, anfíbios, reptéis e aves), e artrópodes hematófagos da ordem Diptera (moscas e mosquitos), Hemíptera (triatomíneos), Siphonaptera (pulgas) e Ixodidae (carrapatos) (HOARE, 1972; VIOLA et al., 2008).

A família Trypanosomatidae é constituída por oito gêneros (SILVA et al., 2002), dentre os quais destacam-se os protozoários pertencentes aos gêneros *Leishmania*, causadores das leishmanioses e *Trypanosoma*, causadores das tripanossomíases; ambos apresentam ciclo de vida bastante complexo, envolvendo hospedeiros vertebrados e insetos vetores (TIRLENS e HELLEMOND, 1998).

O gênero *Leishmania* abrange diversas espécies de tripanosomatídeos que podem afetar o homem e diferentes espécies de animais. A leishmaniose pode apresentar natureza viscerotrópica ou dermatrópica. Na leishmaniose visceral canina, a *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* são as espécies mais comumente isoladas em países do velho mundo e a *Leishmania chagasi* em países do novo mundo. No entanto, estudos enzimáticos e moleculares indicam que *L. chagasi* e *L. infantum* estão proximamente relacionados e, assim, alguns autores consideram *L. chagasi* como sinônimo de *L. infantum*. Na leishmaniose tegumentar, as principais espécies são: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *Leishmania lainsoni*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania lindenbergl* e *Leishmania shawi* ((LUKES et al., 2007; BRASIL, 2010; BRASIL, 2014).

Há muitas espécies de parasitos do gênero *Trypanosoma* descrito em todo o mundo (HOARE, 1972). Os tripanosomas patogênicos de maior importância na Medicina Veterinária são *Trypanosoma brucei brucei*, *T. congolense*, *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma evansi* (LUN e DESSER, 1995; SILVA et al., 2002; UMEZAWA et al., 2009; DESQUENES et al., 2013). Todas essas espécies já foram descritas infectando cães, além das espécies *T. rhodesiense* e *T. gambiense*, espécies responsáveis pela tripanossomíase humana africana, e possuem o cão como reservatório da infecção humana (ELOY e LUCHEIS, 2009; NWOHA, 2013) e recentemente, *Trypanosoma caninum* (MADEIRA et al., 2009).

2.2.1. *Trypanosoma caninum*

Trypanosoma caninum foi identificado pela primeira vez em 2009 por Madeira e colaboradores ao detectarem este agente parasitando a pele de cão co-infectado com *L. braziliensis* na cidade do Rio de Janeiro (MADEIRA et al., 2009). Após essa primeira descrição, novos casos foram descritos na cidade do Rio de Janeiro por Pinto et al. (2010) e em outras regiões do Brasil como Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso (BARROS et al., 2012) e o mais recente caso em Piauí (OLIVEIRA et al., 2015).

Ainda são poucos os trabalhos na literatura referentes ao *T. caninum*, principalmente quanto ao ciclo de desenvolvimento, tropismo e patogenicidade. No entanto, Madeira et al. (2009) descrevem características peculiares desse agente, como não infectar triatomíneos e apresentar isolamento exclusivo em pele, característica considerada incomum do gênero *Trypanosoma*, além da descrição da presença de formas livres de epimastigotas sem flagelo em culturas axênicas (BARROS et al., 2014).

O isolamento deste agente tem ocorrido, até o momento, em áreas endêmicas para leishmaniose visceral canina, aspecto que aliado ao fato do *T. caninum* compartilhar o mesmo reservatório da *L. chagasi*, pressupõe em risco de um diagnóstico errôneo de leishmaniose visceral em cães residentes em áreas de simpatria desses agentes (SILVA et al., 2011; ALVES et al., 2012; BARROS et al., 2012). Diante disto, trabalho realizado por ALVES et al. (2012) visando verificar reação cruzada entre *T. caninum* e *L. chagasi*, demonstrou que *T. caninum* parece ser pouco imunogênico para cães, mesmo sendo capaz de estimular a produção de anticorpos específicos, e a presença de reação cruzada nos testes sorológicos entre esses dois agentes, sugerindo que a infecção por *T. caninum* possa confundir o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Apesar das características clínicas e epidemiológicas associadas à infecção por *T. caninum* serem pouco descritas, a prevalência da infecção por este agente foi estimada em 3,2% (ALMEIDA et al., 2011) na cidade de Cuiabá, 4,7% no Rio de Janeiro, utilizando cultura parasitológica (PINTO et al., 2010) e 10,9% (PINTO et al., 2014) e seu isolamento tem sido mais frequente em cães saudáveis (ALMEIDA et al., 2011).

Madeira et al. (2014) acompanhando 14 cães naturalmente infectados por *T. caninum* na cidade de Cuiabá, onde 78,5% eram machos, 85,7% não tinham raça definida e com média de dois anos de idade, variando de oito meses a oito anos,

71% dos cães estavam em bom estado clínico geral no momento do diagnóstico, sugerindo que a infecção por *T. caninum* possa ser assintomática em cães, sem sinais clínicos específicos e com baixa parasitemia.

Apesar do isolamento restrito à pele, até o momento não foram observada alterações dermatológicas que pudessem decorrer da infecção por *T. caninum*, pois tais sinais foram observados em cães co-infectados por *L. chagasi* (ALMEIDA et al., 2011; MADEIRA et al., 2014).

2.2.2 Diagnóstico da infecção por *Trypanosoma caninum*

A primeira descrição e os diagnósticos subsequentes de *T. caninum* realizados em estudos epidemiológicos para leishmaniose visceral canina foram realizados pelo isolamento em meio de cultura axênica empregando amostras de pele íntegra (MADEIRA et al., 2009; PINTO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011; BARROS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015). Apesar da baixa sensibilidade, a cultura parasitológica é considerada padrão-ouro na identificação e confirmação da circulação do agente em uma determinada região (ALMEIDA et al., 2011).

Alves et al. (2012) identificaram uma baixa especificidade da Reação de Imunofluorescência Indireta e Ensaio imunoenzimático empregando antígeno de *T. caninum*, o que reflete em baixa performance dos métodos sorológicos no diagnóstico do *T. caninum*. Aliado a isso, os mesmo autores avaliaram a reatividade sorológica cruzada nos testes utilizados para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina em cães infectados com *T. caninum* e observaram que 23% deles seriam erroneamente diagnosticado como leishmaniose visceral canina, quando utilizados o ELISA- LVC como teste de triagem e o RIFI-LVC como teste confirmatório.

Análise molecular tem sido o método diagnóstico mais sensível na detecção da infecção por *T. caninum* (PINTO et al., 2014). Reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando *primers* D75 e D76 da região 24S α rDNA da família Trypanosomatidae (SOUTO et al., 1999) e *nested*-PCR utilizando os *primers* externos TRY927F e TRY927R no primeiro *round* e os *primers* internos SSU561F e SSU561R no segundo *round* que amplificam uma região conservada do gene 18S rDNA de todos tripanosomatídeos (SMITH et al., 2008) seguido pelo

sequenciamento (MADEIRA et al., 2009; PINTO et al., 2010; BARROS et al., 2012; MADEIRA et al., 2014).

BARROS et al. (2015) empregando diferentes alvos moleculares como genes da pequena e larga subunidade de DNA ribossomal (18S rDNA e 24S α rDNA), citocromo b, DNA do cinetoplasto (kDNA) e Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) rDNA e Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) demonstram que os isolados de *T. caninum* de diferentes regiões do Brasil apresentam alto grau de similaridade entre si e uma espécie geneticamente homogênea. No entanto, ainda não há uma sequência de *primers* específicos para esta espécie.

2.2.3. *Leishmania chagasi*

Leishmania chagasi (syn. *Leishmania infantum*) é a espécie do gênero *Leishmania* responsável por causar a leishmaniose visceral no Brasil (BRASIL, 2014). A leishmaniose visceral é a forma mais grave das leishmanioses, podendo levar a óbito quando não tratada. Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que a cada ano ocorram de 200.000 a 400.000 novos casos humanos da doença e em 2014 mais de 90% dos novos casos foram reportados em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2016). No Brasil, em 2015 foram diagnosticados 3289 casos humanos de leishmaniose visceral e em Mato Grosso foram 29 casos da doença (BRASIL, 2017).

Transmitida, no Brasil, principalmente pela picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (HARHAY et al., 2011; BRASIL, 2014), a leishmaniose visceral tem apresentado uma expansão para áreas urbanas e região sul do país, anteriormente considerada livre do agente (BRASIL, 2014). Outras vias de transmissão, como por transfusão sanguínea (DE FREITAS et al., 2006), por via transplacentária (ROSYPAL et al., 2005) e por via venérea (SILVA et al., 2009) já foram descritas. A possibilidade de transmissão por *Rhipicephalus sanguineus*, *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis* e *Tabanus importunus* tem sido objeto de estudos (OTRANTO e DANTAS -TORRES, 2010; COELHO e BRESCIANI, 2013). No entanto, de acordo com Savani et al. (2009) a detecção do DNA de *Leishmania* sp não é suficiente para implicar a espécie como vetor.

Em seu contexto epidemiológico, os cães domésticos são considerados importantes reservatórios e mantenedores do ciclo da *L. chagasi* por apresentar intenso parasitismo cutâneo, mesmo os cães assintomáticos, facilitar a infecção dos vetores e, conseqüentemente, a transmissão para a população canina e humana (SOARES et al., 2011; DE QUEIROZ et al., 2011; BRASIL, 2014).

Inquéritos soropidemiológicos sobre a leishmaniose visceral canina no Brasil tem demonstrado prevalências bastante variáveis (ANDRADE et al., 2009; CASTRO JÚNIOR et al., 2014; CURI et al., 2014; BRITO et al., 2016; TEIXEIRA et al. 2016). Em Mato Grosso, foram encontradas prevalências de 3,4% e 64,5% na capital Cuiabá (ALMEIDA et al., 2009; MOREIRA et al., 1999), 23% na cidade de Várzea Grande (FUJIMORI et al., 2016), 54,7% no município de Jaciara (LOPES et al., 2014), 11% em Barra do Graças (De MARCHI et al., 2013), 23,7% e 48,4% em Rondonópolis e 10,42% em Sinop (THIES et al., 2016).

Nos cães, a leishmaniose visceral canina apresenta um quadro clínico multifacetado (BANETH et al., 2008), podendo manifestar-se de forma assintomática ou com envolvimento sistêmico, abrangendo uma ampla variedade de sinais clínicos (CHAMIZO et al., 2005), representados principalmente por linfadenopatia, perda de peso, mucosas hipocoradas, hepatoesplenomegalia, onicogrifose e lesões oftálmicas (SOLANO-GALEGO et al., 2009; SILVA et al., 2017).

Apesar do parasito ter natureza viscerotrópica, a pele representa o principal órgão envolvido na progressão da doença (SILVA, 2007). Alterações cutâneas estão comumente presentes, representando cerca de 70% das alterações clínicas apresentadas pelos cães (MOREIRA et al., 2016), podendo ser os únicos sinais observados (SARIDOMICHELAKIS et al., 2014). As principais alterações cutâneas incluem alopecia, onicogrifose, descamação, lesões ulcerativas, hiperqueratose, hipotricose e presença de crostas localizadas ou generalizadas (SALZO, 2008; SARIDOMICHELAKIS, 2009; SILVA et al., 2017).

Casos de co-infecção da doença com outros agentes também já foram relatados, principalmente com dermatófitos do gênero *Microsporum* e ácaros *Demodex* (MOZOS et al., 1999; MOREIRA et al., 2016). Casos de piodermite por *Staphylococcus* sp, superficial ou profunda também são complicações comuns (SCOTT et al., 2001). Dessa forma, ressalta-se ainda mais a importância da realização de diagnósticos diferenciais nestes animais (CFSPH, 2009).

2.2.4. Diagnóstico de leishmaniose visceral canina

O diagnóstico precoce da leishmaniose visceral canina é fundamental para o controle das complicações da doença (SINGH, 2006; BRASIL, 2014).

Como as manifestações clínicas dos cães infectados podem ser bastante variáveis, as alterações hematológicas, bioquímicas e urinárias, tem grande importância, pois consegue reforçar a suspeita da doença, mesmo não sendo conclusivas para o diagnóstico. Segundo Patrineri et al. (2016) as principais alterações laboratoriais observadas nos cães são: anemia normocítica normocrômica não regenerativa, trombocitopenia, azotemia, hiperproteinemia, diminuição da relação albumina/globulina, proteinúria e diminuição da densidade urinária.

Diferentes técnicas sorológicas, parasitológicas e moleculares têm sido utilizadas para se definir o diagnóstico, entretanto, apresentam sensibilidade e especificidade variáveis (SASSAKI et al., 2011; FURTADO et al., 2015).

O exame parasitológico direto é considerado muito específico, rápido e pouco traumático. Consiste na identificação direta de formas amastigotas do parasito livres ou no interior de macrófagos em esfregaços de aspirados de linfonodo, medula óssea, baço, fígado e pele (LAURENTI, 2009; CUNHA et al., 2014). De acordo com Laurenti (2009), a especificidade do exame parasitológico é de 100%, mas a sensibilidade pode variar, uma vez que os parasitos não são uniformemente distribuídos pelos tecidos.

A cultura parasitológica é a técnica considerada padrão ouro no diagnóstico da leishmaniose visceral canina e apesar de ser considerada pouco sensível (BRASIL, 2014; PINTO et al., 2014), já demonstrou ser um excelente método diagnóstico e confirmatório da circulação do agente, principalmente em áreas de detecção recente da doença (ALMEIDA et al., 2011; BRAGA et al., 2014).

Há uma grande variedade de técnicas sorológicas empregadas na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. As mais utilizadas são: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA), aglutinação direta e fixação de complemento (SILVA et al., 2011; BRASIL, 2014). No Brasil, os testes sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde são o Teste Imunocromatográfico DPP (Dual Path Plataform, Biomanguinhos) como teste de triagem e o ELISA® – (Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina - Biomanguinhos)

como teste confirmatório (BRASIL, 2014; SCHUBACH et al., 2014). Uma desvantagem dos testes sorológicos é a possibilidade de reações cruzadas com outros agentes, portanto, em áreas onde outras espécies de tripanosomatídeos também estão presentes, o diagnóstico sorológico deve ser cuidadosamente utilizado, uma vez que estes agentes podem compartilhar determinantes antigênicos e levar a confusão dos resultados (VEXENAT et al., 1996, MADEIRA et al., 2006; SILVA et al., 2011).

Dos métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e quantitativa tem mostrado alta sensibilidade e especificidade para detecção do DNA de *Leishmania* (REIS et al., 2013; SILVA et al., 2016). Amostras de sangue, linfonodo, medula óssea são as amostras biológicas mais utilizadas. Entretanto, swab conjuntival e pele tem obtido bons resultados na detecção do parasito (MANNA et al., 2004, SOLANO-GALLEGO et al., 2001; XAVIER et al., 2006; DE QUEIROZ et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; GEISWEID et al., 2013).

Alterações histológicas podem ser observadas na infecção por *L. chagasi* em diversos órgãos inclusive na pele (CALABRESE et al., 2010). O quadro histopatológico cutâneo geralmente consiste em infiltrado inflamatório composto por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e mastócitos com ou sem a presença de amastigotas na derme (CALABRESE et al., 2010). O encontro de mais de um padrão inflamatório e de padrões inflamatórios mistos já foi observado na infecção por *L. chagasi* em cães (NETO et al., 2008). Tal fato pode também estar associado a infecções cutâneas concomitantes (GROSS et al., 2005). De Queiroz et al. (2011) em seu trabalho observaram a presença de amastigotas na pele de cães clinicamente saudáveis, bem como em pele lesionada, independentemente do estado clínico do cão, sugerindo que o exame histopatológico da pele não necessariamente precisa ser realizado apenas na pele lesionada, mas também em pacientes clinicamente saudáveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cães

Nesta pesquisa foram selecionados 150 cães atendidos no Hospital Veterinário (HOVET) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), *campus*

Cuiabá, MT, no período de junho de 2015 a abril de 2016, escolhidos aleatoriamente sem distinção de idade, sexo ou raça. O critério de inclusão dos animais foi o consentimento do proprietário em permitir a coleta de todas as amostras biológicas necessárias para desenvolvimento do estudo. O número amostral calculado considerou a população canina atendida no HOVET-UFMT por ano, prevalência de infecção por *T. caninum* de 10,9% (PINTO et al., 2014) e erro aceitável de 0,05.

De todos os cães inseridos na pesquisa foi solicitada ao proprietário a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso sob nº 23108.102289/2015-92 e foi executado de acordo com princípios éticos.

3.2. Análise Clínica- Dermatológica e Exames Complementares

Os cães foram submetidos a investigação epidemiológica e avaliações clínicas geral e dermatológica. Os dados relativos às características morfológicas macroscópicas (localização, formato, intensidade de alterações) e aspecto macroscópicos das lesões foram anotados (SCOTT et al., 2001; GINN et al., 2007), além de características epidemiológicas. De acordo com as alterações cutâneas apresentadas pelos cães foram realizados exames complementares visando complementação diagnóstica definitivo da dermatopatia, como: exame parasitológico direto (raspado cutâneo ou fita adesiva) (PEREIRA et al., 2015); exame da lâmpada de Wood; exame direto e cultura fúngica; tricograma e exame citológico por *imprint* ou aspiração por agulha fina (KEENAN, 2007).

3.3. Detecção da infecção por *Trypanosoma caninum* e *Leishmania chagasi*

Para detectar e caracterizar a infecção por *T. caninum* ou *L. chagasi* foram coletadas amostras de sangue (cerca de 5ml), em tubo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) sódico a 10%, por punção da veia cefálica ou jugular após prévia assepsia, para cultura parasitológica e testes moleculares. Além de cinco fragmentos de pele das áreas lesionadas dos cães apresentando alterações cutâneas e cinco fragmentos de pele íntegra da região escapular dos

cães assintomáticos (ALMEIDA et al., 2010), após tricotomia, antissepsia e anestesia local com lidocaína a 2% utilizando *punch* de 3mm que posteriormente foram processados para cultura parasitológica, testes moleculares e histopatológico.

3.4. Isolamento parasitário em meio de cultura

Os fragmentos de pele e lesão cutânea foram mergulhados em solução salina tamponada estéril contendo antibióticos (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (fluorocitosina) e conservados à 4°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram semeadas em meio bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicole)/Schneider, acrescido de 10% de soro fetal bovino. O sangue coletado em tubo contendo anticoagulante foi semeado diretamente no meio de cultura (400uL). As culturas foram realizadas em duplicatas e conservadas em estufa biológica a 26-28°C e examinadas semanalmente durante 40-50 dias por exames a fresco buscando evidenciar formas flageladas (ALMEIDA et al., 2011).

3.5. Extração de DNA, Reação em cadeia pela polimerase (PCR) e Sequenciamento

A extração de DNA das amostras de pele e sangue foram realizadas pelo método fenol/clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Para a detecção de DNA de *T. caninum* foi empregado o *nested* PCR utilizando os *primers* externos TRY927F (GAAACAAGAAACACGGGAG) e TRY927R (CTACTGGGCAGCTTGGA) no primeiro e os *primers* internos SSU561F (TGGGATAACAAAGGAGCA) e SSU561R (CTGAGACTGTAACCTCAAAGC) no segundo *round* que amplificam uma região parcial conservada do gene 18S rDNA de todos tripanosomatídeos (SMITH et al., 2008). E para a detecção da infecção por *L. chagasi* empregou-se os *primers* RV1 (CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG) e RV2 (CCACCTGGCTATTTTACACCA) que amplificam uma região de 145pb do kDNA específico para esta espécie (LACHAUD et al., 2002).

Para ambos os *primers* utilizou-se como controle positivo o DNA de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75). Os produtos de amplificação foram fracionados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 e 2%, respectivamente, corados com gel Red (Biotium®) e observados em ChemiDoc™ XRS utilizando o software Image Lab™

Software e marcador de massa molecular de 100 pb de DNA Ladder™ (Fermentas®).

Os produtos obtidos pela *nested*-PCR 18S rDNA foram purificados com o kit GFX™ PCR DNA e sequenciados no Sanger Sequencing (Applies Biosystems® Genetic Analysis) de acordo com recomendações do fabricante para caracterização etiológica. As sequências obtidas foram depositadas no GenBank e comparadas com sequências de diferentes espécies de tripanosomatídeos recuperadas no GenBank.

3.6. Análise Histopatológica

Os fragmentos de pele para análise histopatológica foram fixados em solução formalina 10% e encaminhados ao laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso onde foram incluídos em parafina, cortados a 5 µm de espessura e corados pela hematoxilina-eosina (HE) (PROPHET et al., 1992).

3.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados e analisados de forma descritiva e pelo método do qui-quadrado ou Exato de Fischer utilizando o programa EpiInfo 3.3.2 (CDC, Atlanta, EUA) considerando intervalo de confiança de 95% para verificar a associação entre sexo, raça, idade e a presença de alterações dermatológicas e a infecção por *T. caninum* e *L. chagasi*.

4. RESULTADOS

Dos 150 cães pesquisados, 64 (42,7%) eram machos e 86 (57,3%) fêmeas, 77 (51,3%) eram sem raça definida e 73 (48,7%) com raça definida e a idade média foi de 56 meses com intervalo de dois meses a 13 anos (Tabela 2). Destes, 117 (78,0%) apresentaram alterações dermatológicas, sendo as mais comuns, prurido (62,7%), alopecia e/ou hipotricose (60%), descamação (60%), hiperpigmentação

(8%), úlceras cutâneas (6%), crostas melicéricas (4,7%), onicogribose (2,7%) e liquenificação (0,7%).

Na cultura parasitológica houve o isolamento de formas flagelares em duas amostras de pele. Pela análise molecular houve a detecção de DNA de tripanosomatídeos em 21 (14%) cães, independente das amostras e *primersempregados* (Tabela 1). A infecção por *T. caninum* foi detectada em três cães (2,0%), todos em amostras de pele e empregando a *nested-PCR*. A infecção por *L. chagasi* foi detectada em 15 (10%) cães e a infecção por *Trypanosoma evansi* foi detectada em três cães (2%). A positividade para os agentes, alvos, e amostras pesquisadas encontra-se inseridas na tabela 1.

Tabela 1. Taxa de positividade para *Trypanosoma caninum* e *Leishmania chagasi* nas amostras de sangue e pele na análise molecular utilizando os alvos 18S rDNA e *Leishmania* kDNA.

Não foi observada associação estatisticamente significativa ($p>0,05$) quanto a raça, sexo, idade e presença de dermatopatias à infecção por *T. caninum* e *L. chagasi* (Tabela 2).

Agente	Cães	18S rDNA		kDNA	
	n = 150				
	Positivos	Sangue	Pele	Sangue	Pele
<i>Trypanosoma caninum</i>	3	0	3	0	0
<i>Leishmania chagasi</i>	15	1	5	7	6
<i>Trypanosoma evansi</i>	3	3	0	0	0
Total	18	1	8	7	6

Tabela 2. Análise univariada e multivariada dos fatores associados a infecção por *Trypanosoma caninum* e *Leishmania chagasi* nos 150 cães pesquisados.

Em relação à definição racial dos cães positivos para a infecção pelo *T. caninum*, apenas um cão (0,67%) apresentou definição racial, sendo da raça Labrador Retriever. Dos três cães com infecção por *T. evansi*, um pertencia à raça

Variáveis	Trypanosoma caninum			Leishmania chagasi		
	n (%)	Univariada	Multivariada	n (%)	Univariada	Multivariada
		P	P		P	P
		OR (IC95)			OR (IC95)	
Sexo						
Macho (n=64)	02(1,3)	0,3 0,3 (0,1-2,2)	0,3	05(3,3)	0,4 1,5 (0,5-7,4)	0,4
Fêmea (n=86)	01(0,7)			10(6,7)		
Raça						
SRD (n=73)	02(1,3)	0,4 2,1 (0,3-5,6)	0,5	09(6,0)	0,3 1,6 (0,5-6,4)	0,3
CRD (n=77)	01(0,7)			06(4,0)		
Idade (anos)						
Desconhecida (n=24)	02(13)	0,1 ----	0,1	03(2,0)	0,7	0,8
< 1 (n=13)	00(0,0)			02(1,3)		
1-5 (n=69)	00(0,0)			07(4,7)		
5-10 (n=38)	01(0,7)			03(2,0)		
>10 (n=06)	00(0,0)			00(0,0)		
Dermatopatias						
Sim (n=117)	01(0,7)	0,1 7,4 (1,3-19,8)	0,06	12(8,0)	0,5 0,8 (0,2-3,0)	0,8
Não (n=33)	02(1,3)			03(2,0)		

Yorkshire terrier (0,7%), um à raça foxround americano (0,7%) e um (0,7%) não apresentava raça definida. Dos quinze cães com leishmaniose visceral, nove (6,0%)

eram sem raça definida e seis (4,0%) eram de raça pura, sendo Pinscher a raça mais comum com dois (1,3%) exemplares. Os outros quatro cães pertenciam as raças: Pastor Alemão (0,7%), Lhasa Apso (0,7%), American Pitt Bull Terrier (0,7%) e Boxer (0,7%).

A infecção por *T. caninum* foi detectada em dois (1,3%) cães sadios e um (0,7%) cão apresentando as alterações dermatológicas de alopecia, descamação e prurido. Em relação à infecção por *L. chagasi*, três (2%) encontravam-se clinicamente saudáveis e 12 (8%) cães apresentavam alterações dermatológicas. Os principais sinais dermatológicos observados nesses cães foram: alopecia (80%), descamação (66,7%) e prurido (53,3%). A presença de úlceras cutâneas e onicogribose foram constatadas em três (20%) cães. Todos os cães que apresentaram infecção por *T. evansi* não apresentavam dermatopatias.

Dos 150 cães examinados, em 82% foi possível estabelecer o diagnóstico definitivo das dermatopatias e em 18% os resultados foram inconclusivos. Em relação à distribuição das diferentes categorias de diagnósticos, a prevalência encontrada foi: dermatopatias alérgicas (16%), dermatopatias parasitárias (15,3%), dermatopatias fúngicas (14,7%), defeitos da ceratinização (3,3%), dermatopatias bacterianas (2%), dermatites traumáticas (2%), dermatites endócrinas (1,3%), dermatopatias auto-imunes (0,7%) e dermatopatias hereditárias (0,7%).

Ao analisarmos os exames complementares realizados, em 100 (64,7%) cães houve o isolamento em cultura de fungos dermatófitos do gênero *Microsporum* e *Tricophyton*. Destes, 12 (8%) cães foram positivos para *L. chagasi*, um (0,7%) para *T. evansi* e três (2%) para *T. caninum*. A sarna demodécica ou sarcóptica, pelo raspado cutâneo ou fita adesiva, foi detectada em 11 (7,3%) cães. Um (0,7%) dos cães com *Demodex* sp apresentou infecção por *L. chagasi*.

Na análise histopatológica da pele dos três cães infectados pelo *T. caninum*, em dois cães (1,3%) que não apresentavam alterações clínicas foram observados o padrão de infiltrado perivascular linfoplasmocitário leve (Figura 1) e no cão com alterações dermatológicas (0,7%) foi observado a presença de acantose, hiperqueratose ortoqueratótica epidermal discreta e a presença de melanomacrófagos na derme. Em relação à análise da pele dos 15 cães infectados por *L. chagasi* os achados mais observados foram: dermatite perivascular com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário de intensidades variadas em quatro (26,6%), dermatite perivascular linfohistioplasmocitária em dois (13,3%) e as dermatites nos

quais houve associação de dois padrões inflamatórios no mesmo corte em quatro (26.7%), sendo dermatite perivascular/perianexia com infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário moderada em dois (13.3%), dermatite perivascular/perianexa piogranulomatosa leve em um (6.7%) e dermatite perivascular/perifolicular com infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário moderada com presença de amastigotas em um (6.7%) (Figura 2). Em três cães (20%) não foram observadas alterações histopatológicas e em um as alterações sugeriram endocrinopatia caracterizando-se por acantose, hiperqueratose ortoqueratótica da epiderme e do infundíbulo folicular, atrofia dos folículos pilosos e glândulas sebáceas. Nos cães com infecção por *T. evansi* não foram observadas alterações histopatológicas.

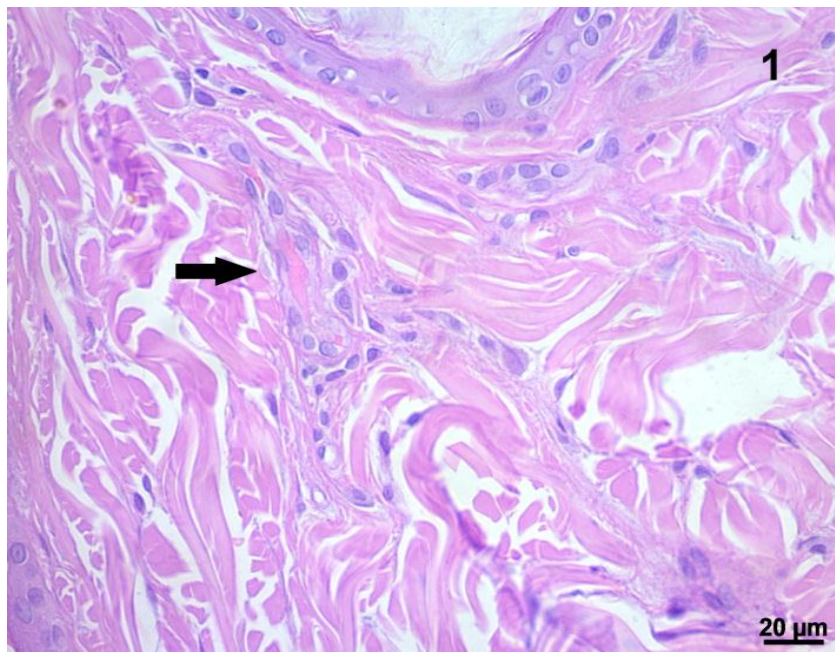


Figura 1: Fotomicroscopia da derme de um cão com infecção por *T. caninum* apresentando infiltrado inflamatório perivascular linfoplasmocitário (seta). (HE).

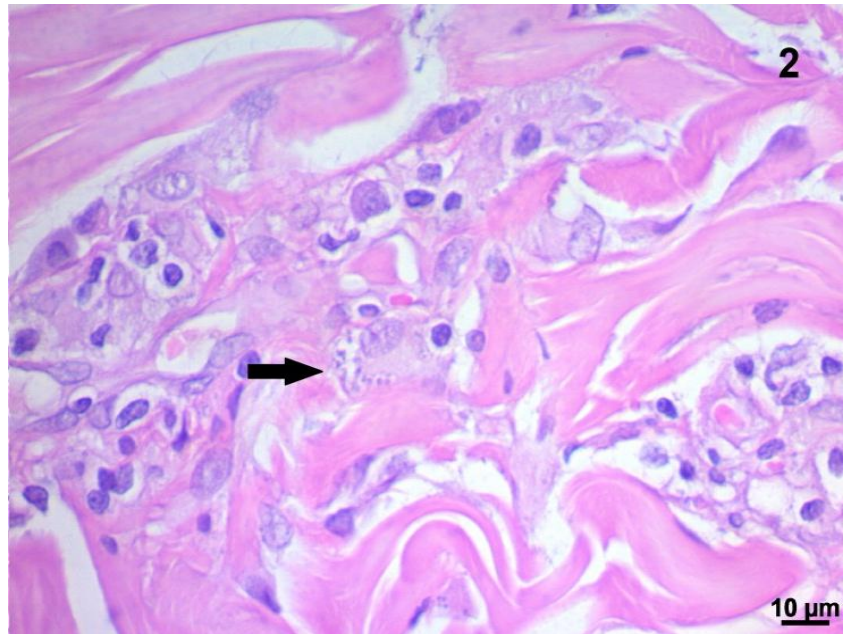


Figura 2: Fotomicroscopia da derme de um cão com infecção por *L. chagasi* com infiltrado perivascular e perifolicular linfohistioplasmocitário e amastigotas de *Leishmania* sp (seta), aumento de 60X (HE).

5. DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, realizada em área endêmica para leishmaniose visceral canina, a infecção de 2% e 8% dos cães por *T. caninum* e *L. chagasi*, condiz com dados obtidos por outros autores (GASPARETTO et al., 2013; PINTO et al., 2014). A infecção canina por diferentes protozoários da Família Trypanosomatidae tem sido descrita (NWOHA, 2013). Neste cenário, a infecção por *L. chagasi* tem importância em saúde pública pela relevância do cão como reservatório (MADEIRA et al., 2006). No entanto, o recente isolamento de *T. caninum* em amostra de pele de cães em áreas endêmicas para leishmaniose visceral tem chamado a atenção para este protozoário (BARROS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Corroborando com outros autores (MADEIRA et al., 2014; PINTO et al., 2014), a infecção por *T. caninum* foi identificada apenas em amostra de pele, mesmo com a utilização de cultura parasitológica e análise molecular de amostras sanguíneas de todos os cães. Todavia a pele também foi a amostra biológica com maior detecção de *L. chagasi*, independente das sequências de gene alvo utilizado.

Apesar do baixo número de cães positivos tais dados reforçam a restrição do *T. caninum* em pele (MADEIRA et al., 2014) e a importância de se promover a diferenciação da infecção por estes agentes, tendo em vista, a importância do cão na epidemiologia da leishmaniose visceral e a alta carga parasitária da pele por amastigotas de *L. chagasi*, mesmo em cães assintomáticos (BARROS et al., 2012).

Similar ao obtido por Pinto et al. (2014), apesar do gene 18S rDNA detectar DNA de *Leishmania*, a utilização dos iniciadores com alvo para região conservada do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *L. chagasi* empregado nesta pesquisa, obteve maior positividade para este agente, o que demonstra ser um bom método diagnóstico para leishmaniose visceral, principalmente em áreas endêmicas e de simpatria. Apesar da baixa sensibilidade já descrita em outros estudos (MADEIRA et al., 2014; PINTO et al., 2014) com o isolamento em cultura parasitológica confirmou-se a circulação dos dois agentes na população pesquisada, aspecto importante em áreas endêmicas (ALMEIDA et al., 2011).

Nesta pesquisa, não foi encontrada associação entre a idade, raça e sexo quanto à infecção por *T. caninum*, *T. evansi* e *L. chagasi*, dado similar ao obtido por diversos autores estudando a leishmaniose visceral canina (ALMEIDA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009). Apesar de trabalhos terem sido realizados investigando os fatores associados à infecção por *L. chagasi*, ainda não há estudos similares referentes à infecção por *T. caninum*, sendo apenas relatado o acometimento de cães saudáveis e entre três e cinco anos de idade (OLIVEIRA et al., 2015). Entretanto, os dados obtidos devem ser analisados com cautela em virtude do baixo número de cães positivos.

As alterações dermatológicas são frequentemente relatadas na infecção canina por *L. chagasi* (SARIDOMICHELAKIS, 2012). Nesta pesquisa os principais sinais dermatológicos apresentados pelos cães positivos para esse agente como alopecia, descamação, prurido, úlceras cutâneas e onicogribose condiz com outros autores (ALMEIDA et al., 2009; SOLANO- GALLEG0 et al., 2009), porém cães assintomáticos podem ser encontrados e com alta prevalência (BARROS et al., 2012), assim como observado nesta pesquisa.

O isolamento e detecção do DNA do *T. caninum* exclusivamente em pele íntegra tem sido considerado aspecto peculiar deste agente (MADEIRA et al., 2014). Para Alves e colaboradores (2012) o *T. caninum* pode desencadear resposta humoral leve que não é suficiente para causar lesões clínicas, no entanto, ainda não

foram descritas possíveis alterações histológicas significativas relacionadas a essa infecção. Neste trabalho, dos cães positivos para a infecção por *T. caninum*, apenas um apresentava alterações dermatológicas, sendo o quadro clínico caracterizado por alopecia multifocal, crostas melicéricas e descamação generalizada. No entanto, na cultura fúngica (MATTEI et al., 2014), confirmou-se nesse caso, a suspeita inicial da coinfeção com dermatofitose, doença micótica de tecidos queratinizados (NWEZE, 2011), que se manifesta clinicamente e causa alterações morfológicas similares às descritas nesse caso com tal sintomatologia (BOND, 2010).

Neste trabalho, não foram observadas alterações dermatológicas e histopatológicas nos cães com infecção por *T. evansi*. Até o momento não foram descritas alterações dermatológicas relacionadas a esse agente, demonstrando que possivelmente esse parasito não tenha predileção pela pele (COMNOR e VAN DEN BOSSCHE, 2004).

A principal alteração histopatológica observada nos cães assintomáticos com infecção por *T. caninum*, foi a presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário leve. No entanto, segundo Hargis e Ginn (2007) apesar dos mastócitos serem encontrados abundantemente na derme, também é comum encontrar células como linfócitos e plasmócitos em menor quantidade em tecido saudável. O encontro de acantose, hiperqueratose ortoqueratótica epidermal e presença de melanomacrófagos no cão com alterações dermatológicas não pôde ser associado à infecção por *T. caninum* tendo em vista à coinfeção por fungos do gênero *Microsporum* sp e *Trichophyton* sp e alterações similares causadas por estes agentes (BOND, 2010)

Alterações histopatológicas compatíveis com dermatite tem sido descritas na leishmaniose visceral canina (DE QUEIROZ et al., 2011), sendo as de padrão perivascular e perifolicular as mais comuns, mesmo na ausência de formas amastigotas de *Leishmania* sp. No entanto, similar ao obtido neste estudo, dermatites crônicas, ou seja, composta por células mononucleares como plasmócitos, macrófagos e linfócitos também são encontrados em cães com e sem leishmaniose visceral e na presença ou não de amastigotas (FIGUEIREDO et al., 2010). A presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário leve que é geralmente encontrado em tecido saudável, foi também observado na pele dos cães com leishmaniose sem sintomatologia clínica assim como nos cães infectados pelo *T. caninum*. Entretanto, nos animais com leishmaniose visceral a infecção

assintomática pode persistir por anos antes do desenvolvimento da sintomatologia clínica (BANETH et al., 2008), enquanto na infecção pelo *T. caninum* não se sabe ainda qual o período de incubação ou se esse parasito é capaz de provocar sinais clínicos nos cães infectados ao longo da evolução da doença.

O encontro de mais de um padrão inflamatório e de padrões inflamatórios mistos e sobreposição de padrões histológicos podem ser observados na infecção por *L. chagasi* em cães (NETO et al., 2008). Tal fato pode também estar associado a infecções cutâneas e doenças concomitantes (GROSS et al., 2005), como nesta pesquisa na qual a infecção por fungos dermatofíticos foi observado em 64.7% dos cães positivos e a presença de hipotireoidismo em um cão, onde se observaram características mais sugestivas de dermatoses atróficas do que de dermatoses parasitárias, pois apesar da leishmaniose visceral canina poder causar uma diversidade de manifestações clínicas e histológicas, geralmente se observa infiltrado inflamatório leve ou acentuado, dependendo das variações de resistência do hospedeiro (CALABRESE et al., 2010).

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelaram prevalência de 2,0% para *Trypanosoma caninum*, 10% para *Leishmania chagasi* e 2,0% *Trypanoma evansi*. A presença de alterações inespecíficas encontrados na histologia de cães com e sem alterações dermatológicas nos leva a inferir que o *T. caninum* possa induzir reação inflamatória cutânea, no entanto, como não se sabe o período de incubação desse parasito, estudos de acompanhamento clínico e laboratorial de cães infectados são necessários para melhor se caracterizar as possíveis alterações clínicas e histológicas induzidas por esse agente.

7. REFERÊNCIAS

AFFOLTER, V. K. Dermatopathology—the link between ancillary techniques and clinical lesions. **Veterinary Dermatology**, 2016.

ALMEIDA, A. B. P. F.; FARIA, R. P.; PIMENTEL, M. F. A.; DAHROUG, M. A. A.; TURBINO, N. C. M. R.; SOUSA, V. R. F. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 156–159, 2009.

ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciencia Rural**, v. 40, p.1610–1615, 2010.

ALMEIDA, A. B. F.; SOUSA, V. R. F.; BOA-SORTE, E. C.; FIGUEIREDO, F. B.; DE PAULA, D. A. J.; PIMENTEL, M. F. A.; DUTRA, V.; MADEIRA, M. F. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 11, p. 555–1560, 2011.

ALMEIDA, A. B.; SOUSA, V. R.; GASPARETTO, N. D.; DA SILVA, G. F.; FIGUEIREDO, F. B.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; MADEIRA, M. F. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 76, n. 3, p. 321-324, 2013.

ALVES, A. S.; MOUTA-CONFORT, E.; FIGUEIREDO, F. B.; OLIVEIRA, R. V. C.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. D. F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1329-1333, 2012.

ANDRADE, A. R. O.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; ARRUDA, C. C. P.; SANTOS, M. F. C.; ROCCA, M. E. G.; AQUINO, R. B. Estudo epidemiológico das leishmanioses em área de turismo ambiental e ecoturismo, Estado de Mato Grosso do Sul, 2006-2007, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 498-493, 2009.

ARGÜERO, N. B., BECERRIL, M. G., GALINDO, C. A. O. & GRIS, G. C. (2008). **Métodos diagnósticos Atlas de dermatología diagnóstica en perros y gatos**. Inter-médica, Buenos Aires, Argentina.

AUJLA, R. S.; SINGLA, L. D.; JUYAL, P. D.; GUPTA, P. P. Prevalence and pathology of mange-mite infestations in dogs. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 14, n. 1, p. 45-49, 2000.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BOURDEAU, P.; FERRER L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitology**. v. 24, p. 324–330, 2008.

BARTA, J. R.; DESSER, S. S. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. **The Journal of Wildlife Diseases** , v. 20, p. 180-189, 1984.

BARROS, J. H. S.; ALMEIDA, A. B. P. F.; FIGUEIREDO, F.B.; SOUSA, V. R. F.; FAGUNDES, A.; PINTO, A. G. S.; BAPTISTA, C.; MADEIRA, M. F. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n.7, p. 419-423, 2012.

BARROS, J. H.; FONSECA, T. S.; MACEDO-SILVA, R. M.; CORTE-REAL, S.; TOMA, H. K.; MADEIRA, M. F. Aflagellar epimastigote forms are found in axenic culture of *Trypanosoma caninum*. **Acta Tropica**, v. 137, p. 147-151, 2014.

BARROS, J. H. S.; TOMA, H. K.; MADEIRA, M. F. Molecular study of *Trypanosoma caninum* isolates based on different genetic markers. **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 777-783, 2015.

BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. Dialogue between skin microbiota and immunity. **Science**, v. 346, n. 6212, p. 954-959, 2014.

BOND, R. Superficial Veterinary Mycoses. **Clinics in Dermatology**. v. 2, p. 226-236, 2010.

BRAGA, A. R. C.; LANGONI, H.; LUCHEIS, S. B. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, p. 5, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar. Americana. Brasília. 2 ed. 2010. 180p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral. Brasília. 1 ed. 2014. 122 p

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Casos.pdf>. Acesso: 07 jan. 2017.

BREITKREUTZ, D.; MIRANCEA, N.; NISCHT, R. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions?. **Histochemistry and cell biology**, v. 132, n. 1, p. 1-10, 2009.

BRITO, F. G.; LANGONI, H.; SILVA, R. C.; ROTONDANO, T. E. F.; MELO, M. A.; PAZ, G. S. Canine visceral leishmaniasis in the Northeast Region of Brazil. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 22, p. 15, 2016.

CALABRESE, K. S.; CORTADA, V. M. C. L.; DORVAL, M. E. C; LIMA, M. S.; OSHIRO, E. T.; SOUZA, C. S. F; SILVA-ALMEIDA, M.; CARVALHO, L. O. P.; GONÇALVES DA COSTA, S. C.; ABREU-SILVA, A. L. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*. Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Experimental parasitology**, v. 124, n. 3, p. 253-257, 2010.

CAMPBELL, K. L. Small Animal Dermatology Secrets. **Hanley & Belfus**. 1 ed. Elsevier Health Sciences. 2004. 512p.

CARDOSO, M. J. L.; MACHADO, L. H. A.; MELUSSI, M. Dermatopatias em cães: revisão de 257 casos. **Archives of Veterinary Science**, v. 16, n. 2, p. 66-74, 2011.

CARDOSO, P. O.; GIFFONI, R. T.; ALBERTI, L. R. Perfil epidemiológico das doenças dermatológicas em Centro de Saúde de Atenção Primária. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 23, n. 2, p. 169-172, 2013.

CASTRO-JÚNIOR, J. G.; FREIRE, M. L.; CAMPOS, S. P. S.; SCOPEL, K. K. G.; PORROZZI, R.; DA SILVA, E. D.; COLOMBO, F. A.; SILVEIRA, R. C. V.; MARQUES, M. J.; COIMBRA, E. S. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais state, Brazil, based on Immunochromatographic Dual-path Platform (DPP®) and pcr assays. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 225-229, 2014.

CFSPH (The Center for Food Security and Public Health). Leishmaniasis (cutaneous and visceral). **College of Veterinary Medicine**, Iowa State University Ames: Iwoa. 2009. 11p.

CHAMIZO C.; MORENO J.; ALVAR J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 67–75, 2005.

CHERMETTE, R.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatophytoses in animals. **Mycopathologia**, v.166, p. 385–405, 2008.

COELHO, W. M. D.; BRESCIANI, K. D. S. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in a dipteran of the species *Tabanus importunus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 605-607, 2013.

CONCEIÇÃO, L. G.; LOURES, F. H.; FABRIS, V. E. Biópsia e histopatologia da pele: um valioso recurso diagnóstico na dermatologia – revisão - Parte II. **Clínica Veterinária**, v. 52, p. 28-40, 2004.

CONNOR, R. J.; VAN DEN BOSSCHE, P. **African animal trypanosomoses**. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN R. C. 2 ed. Infectious Diseases of Livestock. Oxford University Press: Cape Town, 2004, p.251-296.

CUNHA, R. C.; ANDREOTTI, R.; COMINETTI, M. C.; SILVA, E. A. Detecção de *Leishmania infantum* em *Lutzomyia longipalpis* capturados em Campo Grande, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 269-273, 2014.

CURI, N. H. A.; Paschoal, A. M. O.; Massara, R. L.; Marcelino, A. P.; Ribeiro, A. A.; Passamani, M.; Demétrio, G. R.; Chiarello, A. G. Factors Associated with the Seroprevalence of Leishmaniasis in Dogs Living around Atlantic Forest Fragments. **Plos one**, v. 9, n. 8, e104003, 2014.

DE ANDRADE BRAGA, C.; DE OLIVEIRA ARRUDA, A. F.; CASTRO, M. C. N.; SOARES, A. M. B.; DIECKMANN, A. M. Perfil dos cães e gatos dermatopatas atendidos na Policlínica da Faculdade de Veterinária da UFF–março/98–fevereiro/2004, Niterói, RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 17, n. 2, 2010.

DE MARCHI, P.G.F.; MASCARENHAS, L.A.; DE REZENDE LAGO, N.C.M. Levantamento sorológico de leishmaniose visceral canina no município de Barra do Garças/MT. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 2, n. 10, 2013.

DE FREITAS, E.; MELO, M. N.; DA COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. M. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors, **Veterinary Parasitology**, v. 137, p.159-167, 2006.

DESQUESNES, M.; HOLZMULLER, P; LAI, D. H.; DARGANTES, A.; LUN, Z. R.; JITTAPLAPONG, S. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. **BioMed Research International**, v.2013, p. 22, 2013.

DE QUEIROZ, N. M.; ASSIS, J. D.; OLIVEIRA, T. M.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; STARKE-BUZETTI, W. A. Canine visceral leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with RIFI and ELISA-test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

DE QUEIROZ, N. M.; DA SILVEIRA, R. C.; DE NORONHA, A. C., JR.; OLIVEIRA, T. M.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88-126.

ELIAS, P.; FEINGOLD, K.; FLUHR, J. The skin as an organ of protection. In: FRIEDBERG, I. M.; EISEN, A.Z.; WOLFF, K.; AUSTEN, K.F.; GOLDSMITH, L. A.; KATZ, S. I. **Dermatology in General Medicine**. New York: McGraw-Hill, 2003, p 107–118.

ELOY, L. J.; LUCHEIS, S. B.; Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implications for public health. **Journal of Venomous Animals Toxins including Tropical Disease**, v. 15, n. 4, p. 589-611. 2009.

FIGUEIREDO, M. M.; MOURA, E. P.; COSTA, M. M.; RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 27, p. 877-887, 2010.

FUJIMORI, M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; DIAS, A. F. L. R.; RODRIGUES, J. Y.; NAKAZATO, L.; MADEIRA, M. F.; SOUSA, V. R. F. Prevalence and associated factors of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Mato Grosso, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1424, 2016.

FURTADO, M. C.; MENEZES, R. C.; KIUPEL, M.; MADEIRA, M. F.; OLIVEIRA, R. V. C.; LANGOHR, I. M.; FIGUEIREDO, F. B. Comparative study of in situ hybridization,

immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 620, 2015.

GARCIA, R. C.; REY, M. C.; BERND, L. A. Dermatoses não-alérgicas: desafios diagnósticos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 28, n. 5, p. 222-229, 2005.

GASPARETTO, N. D.; TREVISAN, Y. P. A.; ALMEIDA, N.; NEVES, R. C. M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; DUTRA, V.; COLODEL, E. M.; SOUSA, V. R. F. Prevalência das doenças de pele não neoplásicas em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 359-362, 2013.

GEISWEID, K.; WEBER, K.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. Evaluation of a conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic área. **The Veterinary Journal**, v.198, p.187–192, 2013.

GINN, P. E.; MANSEL, J. E. K. L.; RAKICH, P. M. Skin and appendages. In: MAXIE, M.G. (Org.). **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals**. 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, p. 553-781.

GRICE, E. A. The intersection of microbiome and host at the skin interface: genomic- and metagenomic-based insights. **Genome research**, v. 25, n. 10, p. 1514-1520, 2015.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Skin diseases of the dog and cat. **Clinical and histopathologic diagnosis**. 2 ed. Ames: Blackwell Science. 2005. 944p.

KAUFMANN, R.; BLUM, S. E.; ELAD, D; ZUR, G. Comparison between point-of-care dermatophyte test medium and mycology laboratory culture for diagnosis of dermatophytosis in dogs and cats. **Veterinary Dermatology**, v. 27, p. 284–e68, 2016.

KEENAN, L. D. Micoses superficiais – Dermatofitoses. **Revista Nosso Clínico**; v. 10, n. 57, p. 6-13, 2007.

KHOSHNEGAH, J.; MOVASSAGHI, A. R.; RAD, M. Survey of dermatological conditions in a population of domestic dogs in Mashhad, northeast of Iran (2007-2011). **Veterinary Research Forum**, v. 4, n. 2, p. 99-103, 2013.

HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 37-49, 1998.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N.; Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, 2011.

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. The integument. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic basis of veterinary disease**. Mosby: St Louis, 2007. p.1107-1261.

HNILICA, K. Dermatologia de pequenos animais. **Atlas colorido e guia terapêutico**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2011. 632p.

HOARE, C. A. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. **Journal of small animal practice**, n.11 v.13 p. 671-672, 1972.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection on canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 210–215, 2002.

LAURENT, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral canina. **Bepa**, v.67, p.13-23, 2009.

LOPES, P. M.; BOA SORTE, E. C.; GASPARETTO, N. D.; OLIVEIRA, C. M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F. Seroprevalence and risk factors associated with visceral leishmaniasis in dogs in Jaciara, State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n.6, p.791-795, 2014.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J.C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.P.; KUHL, K.; TINTAYA, K.W.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F.J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

LUKEŠ, J.; SKALICKÝ, T.; TÝČ, J.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115-122, 2014.

LUN, Z. R.; DESSER, S. S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? **Parasitology Today**, v. 11, p. 131-133, 1995.

MACHICOTE, G.; YOTTI, C. Consulta de Difusión Veterinaria. Importancia de la historia clínica en la alergia. **Canis et Felis**, v. 75, n. 9, p. 18-47/53/66-70, 2005.

MADEIRA, M.; SCHUBACH, A. D. O.; SCHUBACH, T. M.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; LEAL, C. A.; MELO, C. X.; CONFORT, E. M.; MARZOCHI, M. C. A. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 138, n. 3, p. 366-370, 2006.

MADEIRA, M. F.; SOUSA, M. A.; BARROS, J. H.; FIGUEIREDO, F. B. *Trypanosoma caninum* n. sp.(Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog

(*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology**, v. 136, n. 04, p. 411-423, 2009.

MADEIRA, M. F.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BARROS, J. H.; OLIVEIRA, T. S. F.; SOUSA, V. R. F.; ALVES, A. S.; MIRANDA, L. F. C.; SCHUBACK, A. O.; MARZOCHI, M. C. A. *Trypanosoma caninum*, a new parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. **Journal of Parasitology**, v. 100, p. 231–234, 2014.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; DELLA MORTE, R.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 251–62, 2004.

MATTEI, A. S.; MADRID, I. M.; SANTIN, R.; DAMÉ SCHUCH, L. F.; MEIRELES, M. C. A. Presença de fungos com potencial patogênico em instrumentos de tosa. **Archives of Veterinary Science**, v. 19, n. 2, 2014.

MENDELSON, C.; ROSENKRANTZ, W.; GRIFFIN, C. E. Practical Cytology For Inflammatory Skin Diseases. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, p. 117-127, 2006.

METZ, M.; STÄNDER, S. Chronic pruritus – pathogenesis, clinical aspects and treatment. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, p. 1249–1260, 2010.

MOZOS, E.; PÉREZ, J.; DAY, M. J.; LUCENA, R.; GINEL, P. J. Leishmaniosis and Generalized Demodicosis in Three Dogs: a Clinicopathological and Immunohistochemical Study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p. 257-268, 1999.

MOREIRA, N. B.; ALMEIDA, A. B. P. F.; PINTO, A. Z. L.; MUTZEMBERG, E. R.; GODOY, I.; SILVEIRA, M. M.; DUTRA, V.; SOUSA, V. R. F. Leishmaniose visceral canina: aspectos dermatológicos e dermatoses associadas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1362, 2016.

MOURA, S. T.; FERNANDES, C. G. N.; PANPHOLDO, V. C.; RODRIGUES e SILVA, R. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n. 2, 1999.

MUELLER, R. S. **Dermatology for the Small Animal Practitioner**. Teton New Media, Jackson. 2000. p.21-30.

NAGATA, M.; SAKAI, T. Clinical survey of canine dermatosis in Japan. **Journal of the Japanese Veterinary Medical Association**, v. 52, p. 775-779, 1999.

NEUWALD, E. B.; RIBEIRO, V. L. S.; SEIBERT, M.; TORRES, J. R. **Prevalência das acarioses de cães e gatos diagnosticados no laboratório de entomologia da FAVET/UFGS de 2000 a 2003**. In: Resumo do XXV Congresso Brasileiro de

Clínicos Veterinários de Pequenos Animais. (Gramado: ANCLIVEPA Brasil). p. 40, 2004.

NETO, R. T.; RODRIGUES, M. M.; AMORIM, R. L.; LUVIZOTTO, M. C. CONCEIÇÃO, L. G.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FRANCO, S. R. V. S. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose. **Semina Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 667-676, 2008.

NWOHA, R. I. O. A review on trypanosomosis in dogs and cats. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 46, p. 6432-6442, 2013.

OLIVEIRA, L. C. P. D.; ARAÚJO, R. R. D.; ALVES, C. R.; MOUTA-CONFORT, E.; LÓPEZ, J. A.; MENDONÇA-LIMA, F. W. D. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 400-404, 2009.

OLIVEIRA, T. D. S. F. D.; BARROS, J. H. S.; PEREZ, T. D.; FIGUEIREDO, F. B.; MENDES JUNIOR, A. A. V.; MADEIRA, M. F. Report of new cases of *Trypanosoma caninum* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 347-349, 2015.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania* spp. to dogs: caution is needed. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1-2, p. 173-2010.

PALTRINIERI, S.; GRADONI, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 552-578, 2016.

PEREIRA, A. V.; PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; CAMPOS, M. P.; FERREIRA, A. M. R. Comparison of acetate tape impression with squeezing versus skin scraping for the diagnosis of canine demodicosis. **Australian veterinary journal**, v. 90, n. 11, p. 448-450, 2012.

PEREIRA, D. T.; CASTRO, L. J. M.; CENTENARO, V. B.; AMARAL, A. S.; KRAUSE, A.; SCHMIDT, C. Skin impression with acetate tape in *Demodex canis* and *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes* diagnosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 49-54, 2015.

PINTO, A. G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; FAGUNDES, A.; BARROS, J. H. S.; DE PAULA, C. C.; TOMA, H. K.; MADEIRA, M. F. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology**, v.137, p. 1653–1660, 2010.

PINTO, A. G. S.; TOMA, H. K.; FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F. Evaluation of 18S rDNA PCR assay using skin fragments as a diagnostic test for *Trypanosoma caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 343–346, 2014.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B. **Laboratory Methods in Histotechnology Washington**, 1 ed. DC: American Registry of Pathology, 1992. 279p.

QUARESMA, P. F.; RÊGO, F. D.; BOTELHO, H. A.; SILVA, S. R.; MOURA JUNIOR, A.J.; TEIXEIRA NETO, R. G.; MADEIRA, F. M.; CARVALHO, M. B.; PAGLIA, A. P.; MELO, M. N.; GONTIJO, C. M. F. F. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 579-585, 2011.

REIS, L. E. S.; COURA-VITAL, W.; ROATT, B. M.; BOUILLET, L. E. M.; KER, H. G.; BRITO, R. C. F.; RESENDE, D. M.; CARNEIRO, M.; GIUNCHETTI, R. C.; MARQUES, M. J.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, v.197, p. 498– 503, 2013.

ROSYPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M.; FRANK, G.; LINDSAY, D. S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected Beagle, **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 970-970, 2005.

ROBERT, R.; PIHET, M. Conventional methods for the diagnostic of dermatophytosis. **Mycopathology**, n. 166, p. 295-306, 2008.

RUSSELL, R. C.; OTRANTO, D.; WALL, R. L. Mites (Arachnida: Acari). **The encyclopaedia of medical and veterinary entomology**, v. 209-242, 2013.

SALZO, P. S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. **Nosso clínico**, v. 63, p. 30-34, 2008.

SAMPAIO, A. L.; RAE, G. A.; HENRIQUES, M. M. Role of endothelins on lymphocyte accumulation in allergic pleurisy. **Journal of leukocyte biology**, v. 67, n. 2, p. 189-195, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning A Laboratory Manual**. 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001. p. 6.4 - 6.11.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 471– 489, 2009.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. An approach to erosions and ulcerations. In: JACKSON H, MARSELLA R, eds. **BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology**. 3 ed. Gloucester: BSAVA, 2012, p. 57–64.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Veterinary dermatology**, v. 25, n. 2, p. 61-e22, 2014.

SASSAKI, C. Y.; COLODEL, M. M.; FERREIRA, I.; NOGUEIRA, F. S.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H.; ROCHA, N. S. Comparison of different diagnostic tests in dogs uninfected and naturally infected with visceral leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 348-352, 2011.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 18-24, 2009.

SCHARSCHMIDT, T. C.; FISCHBACH, M. A. What lives on our skin: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 10, n. 3, p. 83-89, 2013.

SCHUBACH, E. Y. P.; FUGUEIREDO, F. B.; ROMERO, G. A. S. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 9, p. 568-574, 2014.

SCOTT, D. W.; MILLER D. H.; GRIFFIN C. E. Muller and Kirk's - **Small Animal Dermatology**. 6 ed. Philadelphia: Saunders, 2001. 1528p

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

SILVA, R. A. M. S.; RIVERA D'AVILA.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L. **Trypanosoma evansi e Trypanosoma vivax – Biologia, Diagnóstico e Controle**. 1 ed. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 141p.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, 20p, 2007.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 55-59, 2009.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; TEIXEIRA, A. C.; SOUZA, C.M.; FIGUEIREDO, F.B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 257-261, 2011.

SILVA, R. C.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; KIKUTI, M.; MARSON, P. M.; LANGONI, H. Detection of *Leishmania (L.) infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. **Veterinary Quarterly**, v. 37, n. 1, p. 23-30, 2016.

SILVA, K. R. D.; MENDONÇA, V. R. R. D.; SILVA, K. M.; NASCIMENTO, L. F. M. D.; MENDES-SOUSA, A. F.; PINHO, F. A. D.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A. M. P.; CRUZ, M. S. C. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral

leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 53-63, 2017.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 311-330, 2006.

SHAHZAD, Y.; AFREEN, U.; NISAR HUSSAIN SHAH, S.; HUSSAIN, T. Applying response surface methodology to optimize nimesulide permeation from topical formulation. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 18, p. 1391-1398, 2013.

SMITH, A.; CLARK, P.; AVERIS, S.; LYMBERY, A. J.; WAYNE, A. F.; MORRIS, K. D. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed Bettongia penicillata (Marsupialia: Potoroidae). **Parasitology**, v. 135, p. 1329-1335, 2008.

SOARES, M. R.; MENDONÇA, I. L.; BONFIM, J. M.; RODRIGUES, J. A.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Tropica**, v. 117, p. 6-9, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

SOUTO, R. P.; VARGAS, N.; ZINGALES, B. *Trypanosoma rangeli* : Discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. **Experimental Parasitology**, v. 91, p. 306-314, 1999.

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p.177-190, 2009a

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; SCHMIDT, C.; RÉQUIA, A. H.; BRUM, J. S.; MARTINS, T. B.; BARROS, C. S. L. Prevalência das dermatopatias não-tumorais em cães do município de Santa Maria, Rio Grande do Sul (2005-2008). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 157-162, 2009b.

TEIXEIRA, M. C.; STOBBE, N. S.; SCHMIDT, V.; DE LIMA, V. M. F.; TARTAROTTI, A. L.; RAMOS, R. R.; DE ARAUJO, F. A. P. Seroepidemiology of *Leishmania infantum* in dogs in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 6, p. 4077-4084, 2016.

TIRLENS, A. G. M.; HELLEMOND, J. J. Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. **Parasitology Today**, v. 14, n. 7, p. 265-71, 1998.

THIES, S. F.; SILVA, D. J.; SLOBODA, L.; DIAS, E. S.; DAMAZO, A. S.; BRONZONI, R. V. M. **Diagnóstico de Leishmania chagasi em Cães de Município não Endêmico, Através de Testes Sorológicos e Moleculares**. In: 52 Congresso Brasileiro de Medicina Tropical. (Maceió: 52 Congresso Brasileiro de Medicina Tropical), 2016.

TORRES, F. D.; FIGUEIREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A da G. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 4, p. 151-154, 2004.

UMEZAWA, E.S.; SOUZA A.I.; PINEDO-CANCINO, V.; MARCONDES, M.; MARCILI, A.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, A. A.; STOLF, A. M. S.; TEIXEIRA, M. G. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, v.111, p.15-20, 2009.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 177–85, 1996.

VIOLA, L. B.; ALMEIDA, R. S.; FERREIRA, R. C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A.; RODRIGUES, A. C; PAIVA, F.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. **Parasitology**, n. 136, p. 55–65, 2008.

WERNER, J. Padrões dermatohistopatológicos no diagnóstico dermatológico. **Clínica Veterinária**, v. 13, p. 38-42, 2008.

WERNER, B. Biópsia de pele e seu estudo histológico. Por quê? Para quê? Como? **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 4, p. 391-395, 2009.

WILKINSON, G.; HARVEY, R. G. Doença parasitária. **Atlas Colorido de Dermatologia dos Pequenos Animais – guia para o diagnóstico**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1996, p. 53-87.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organ Fact Sheet**, v. 340, 2014.

WHO, 2016. World Health Organization: Leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 27/01/2017.

XAVIER, S. C; ANDRADE, H. M.; MONTES, S. J. H.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Comparison of paraffin – embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for

detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 17, p. 1-7, 2006.

8. APÊNDICE

Prevalence and clinical and histological cutaneous changes associated with *Trypanosoma caninum* and *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs

Herica Makino^a, Janaina Marcela Assunção Rosa Moreira^a, Kalinne Stephanie Bezerra^a,
Amanda Atsumy Funakawa Otsubo^b, Juliano Bortolini^c, Valéria Régia Franco Sousa^b, Valeria
Dutra^b, Edson Moleta Colodel^b, Luciano Nakazato^b, Arleana do Bom Parto Ferreira de
Almeida^b

^a Postgraduate Program in Veterinary Science, Federal University of Mato Grosso (UFMT),
Cuiabá, MT, Brazil.

^b Faculty of Veterinary Medicina (FAVET), UFMT, Cuiabá, MT, Brazil.

^c Departament of Statistics , Institute of exact and Earth Sciences, Federal University of Mato
Grosso, UFMT, Cuiabá, MT, Brazil.

Corresponding author: Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida, Departament of
Veterinary Medical Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Mato
Grosso, UFMT, Cuiabá, Brazil. Telephone: +55(65) 36158662, Fax: +55(65) 36158662,
email: arleferreira@gmail.com

ABSTRACT

Leishmania chagasi is one of the main trypanosomatids that cause dermatopathy in dogs, but
Trypanosoma caninum has been isolated in dog skin in several regions of Brazil. The
objective of this study was to investigate the prevalence of *T. caninum* in dogs in order to
investigate possible clinical and histological skin changes associated with infections by this
agent and to compare the findings to those obtained with *L. chagasi* infection. Of the 150

dogs surveyed, a *T. caninum* infection was detected in three (2%) dogs and an *L. chagasi* infection in 15. There was no statistically significant association ($p > 0.05$) with race, sex, age, and the presence of dermatopathies. Dermatological changes were observed in one (4.8%) and 12 (57.1%) dogs infected by *T. caninum* and *L. chagasi*, respectively. In the histopathological analysis of the skin of dogs infected with *T. caninum*, two dogs did not show clinical dermatopathy. These dogs showed a perivascular infiltrate with a mild lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate. The dog with clinical dermatological alterations showed a co-infection with fungi of the genus *Microsporum* sp. and *Trichophyton* sp., which was associated with acanthosis, epidermal orthokeratotic hyperkeratosis, and the presence of melanomacrophages. The most common finding in the skin analysis of dogs infected with *L. chagasi* was chronic granulomatous inflammatory infiltrate. One dog was found to have a structure that was morphologically consistent with amastigotes of *Leishmania* sp. The presence of nonspecific changes found in the histology of dogs with and without dermatopathies leads us to infer that *T. caninum* may not induce a cutaneous inflammatory reaction; however, more studies are necessary to better characterize the clinical and histological changes induced by this agent.

Keywords: dermatopathies, histopathology, *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma caninum*

1. Introduction

Parasitic infections are commonly found in dogs (Souza et al., 2009; Cardoso et al., 2011; Gasparetto et al., 2013). In addition, parasitic infection also assumes an important role for its magnitude and potential as a zoonosis (Cardoso et al., 2011; Gasparetto et al., 2013).

Among parasitic dermatoses, those caused by the protozoa of the Trypanosomatidae family, especially those of the genus *Leishmania*, are relevant to dogs residing in endemic areas of Brazil (Gasparetto et al., 2013). Although many species of the genus *Trypanosoma*

are described (Hoare, 1972), there is no defined condition for the dermatological changes in dogs caused by these parasites. However, in 2009, the identification of a new species of *Trypanosoma* parasitizing the skin of a dog co-infected with *Leishmania braziliensis*, called *Trypanosoma caninum* (Madeira et al., 2009), underlined the need for a definition.

Little is known about the development cycle, tropism, and pathogenicity of *T. caninum* (Madeira et al., 2009). The fact that the isolation of *T. caninum* is only in the skin, which is unusual of the *Trypanosoma* genus, to share the same reservoir of *L. chagasi* (syn. *L. infantum*) the infectious agent of visceral leishmaniasis, and that it has been isolated from several regions of Brazil, (Alves et al., 2012; Oliveira et al., 2015), has been found to be related to the possible clinical aspects associated with the canine infection (Madeira et al., 2014) and public health, especially the risk of an erroneous diagnosis of canine visceral leishmaniasis (LVC) in areas of sympatry of *L. chagasi* and *T. caninum* (Almeida et al., 2011; Alves et al., 2012).

These aspects motivated this study, which aimed to investigate the prevalence of *T. caninum* in dogs treated at the University Veterinary Hospital. In addition, the study aimed to determine the possible dermatological and histological changes in *T. caninum* infections in order to compare them to the changes in an *L. chagasi* infection.

2. Materials and methods

2.1. Dogs

In this study, 150 dogs were randomly selected, without the differentiation of age, sex or race, and seen at the Veterinary Hospital (HOVET) of the Federal University of Mato Grosso (UFMT) Campus Cuiabá, Mato Grosso. The sample number was determined based on the canine population served at the HOVET-UFMT annually, a *T. caninum* infection prevalence of 10.9% (Pinto et al., 2014), and a margin of error no greater than 0.05.

This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Use (CEUA) of UFMT under nº 23108.102289 / 2015-92 and executed according to the ethical principles. Informed consent was signed by the owner of each dog.

2.2. Clinical Analysis - Dermatology and Complementary Examinations

Dermatological, epidemiological and general clinical evaluations were performed on the dogs. The data related to the dermatological changes includes macroscopic morphological characteristics (location, shape, intensity of changes), the macroscopic aspect of the lesions (Ginn et al., 1972; Scott et al., 2001) and epidemiological characteristics. Based on the cutaneous changes found in the dogs and focusing on determining the definitive diagnosis for the dermatopathy, complementary examinations, including the following, were performed: direct parasitological examination (samples acquired via skin scrapings or adhesive tape; (Pereira et al., 2015); Wood lamp examination; microscopic direct examination and fungal culture; and cytologic examination by fine needle aspiration (Keenan, 2007).

2.3. Detection of *Trypanosoma caninum* and *Leishmania chagasi* infection

To detect and characterize the infection by *T. caninum* or *L. chagasi*, blood samples (approximately 5 ml) were collected by cephalic or jugular puncture using aseptic technique and placed in a 10% sodium EDTA anticoagulant tube for parasitological culture and molecular tests. Beside that, five skin fragments of the scapular region of asymptomatic dogs were collected after tricotomy, antisepsis and local anesthesia with 2% lidocaine, using a punch of 3 mm. (Almeida et al., 2010). The skin samples were subsequently processed for parasitological culture, molecular and histopathological tests.

2.4. Parasitic isolation in culture medium

The skin fragments were immersed in sterile buffered saline containing antimicrobials (2 antibiotics and an antifungal: penicillin, streptomycin, and fluorocytosine) and preserved at 4°C for 24 hours. The samples were then seeded in Novy, MacNeal, Nicole (NNN)/Schneider biphasic medium plus 10% fetal bovine serum. Peripheral blood collected in tubes containing anticoagulant were seeded directly into the culture medium (400 µL). The cultures were seeded in duplicates, placed in an incubator at 26-28°C, and examined weekly for 40-50 days by fresh tests to detect flagellate forms (Almeida et al., 2011).

2.5. DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) and sequencing

DNA extraction from the skin and blood samples was performed using the phenol/chloroform method (Sambrook and Russell, 2001). For the detection of *T. caninum* DNA, a nested PCR was used with the outer primers TRY927F and TRY927R during the first round and the internal primers SSU561F and SSU561R, which amplify a conserved region of the 18S rDNA gene of all trypanosomatids (Smith et al., 2008), during the second round. For the detection of an *L. chagasi* infection, RV1 and RV2 primers were used to amplify a 145 bp region of kDNA specific for this species (Lachaud et al., 2002). For both sets of primers, the *L. chagasi* DNA (MHOM/BR/1974/PP75) was used for the positive and negative (DNA free reaction) controls.

The amplification products of the nested PCR and *L. chagasi* specific PCR were fractionated by 1.5% and 2% agarose gel electrophoresis, respectively, stained with Red gel (Biotium®) and viewed with ChemiDoc™ XRS using Image Lab™ Software. A molecular weight marker of 100 bp of DNA Ladder™ (Fermentas®) was used. The products obtained by the 18S rDNA nested PCR were purified using the GFX™ PCR DNA kit and sequenced using Sanger Sequencing (Applies Biosystems® Genetic Analysis) for etiological

characterization. The sequences obtained were deposited and compared to sequences of different species of trypanosomatids using GenBank.

2.6. Histopathological Analysis

The skin fragments for histopathological analysis were fixed in a 10% formalin solution, embedded in paraffin, cut into 5- μ m-thick sections, and stained with hematoxylin-eosin (HE; Prophet et al., 1992).

2.7. Statistical analysis

The data were tabulated and analyzed in a descriptive manner and by either chi-squared analysis or Fisher's Exact test using the EpiInfo 3.3.2 program (CDC, Atlanta, USA), with a 95% confidence interval, in order to verify the association between sex, race, age and the presence of dermatological changes and infection by *T. caninum* and *L. chagasi*.

3. Results

Of the 150 dogs surveyed, 64 (42.7%) were male and 86 (57.3%) were female. Seventy-seven (51.3%) were undefined race and 73 (48.7%) were of a defined race. The mean age was 56 months, ranging from 2 months to 13 years (Table 2). Of these, 117 (78%) presented with dermatological changes. The most common condition was pruritus (62.7 %). The other conditions seen included alopecia and/or hypotrichosis (60%), desquamation (60%), hyperpigmentation (8%), cutaneous ulcers, meliceric crusts (4.7%), onychogribose (2.7%), and lichenification (0.7%).

In the parasitological culture, flagellar forms were isolated from two skin samples. By molecular analysis, trypanosomatid DNA was detected in 18 (12%) dogs, independent of the samples and primers used (Table 1). *T. caninum* infection was detected in three dogs (2.0%),

all from skin samples, and identified using nested PCR. *L. chagasi* was detected in 15 (10%) dogs. The positivity values for the agents, primers, and samples investigated are included in Table 1.

T. caninum and *L. chagasi* infections were not significantly associated ($p > 0.05$) with race, sex, age, or the presence of dermatopathies (Table 2). *T. caninum* infection was detected in two (1.3%) clinically healthy dogs, and one (0.7%) had skin pruritus with alopecia and desquamation. In the present study, *L. chagasi* infection was found in three (2.0%) and 12 (8.0%) dogs who showed the following clinical findings: alopecia (80%), desquamation (66.7%), and pruritus (53.3%). Cutaneous ulcers and onychogriphosis were observed in three (20%) dogs.

Of the 150 dogs examined, it was possible to establish the presumptive diagnosis of a dermatopathy by clinical laboratory and histopathological analysis in 82%; in 18%, the results were inconclusive. The prevalence of the different diagnoses was as follows: allergic dermatopathies (16%), parasitic skin diseases (15.3%), fungal dermatopathies (14.7%), keratinization defects (3.3%), bacterial dermatopathies (2.0%), endocrine dermatitis (1.3%), autoimmune dermatopathies (0.7%) and hereditary dermatopathies (0.7%).

In the complementary tests performed, the cultures of 100 (66.7%) dogs showed dermatophyte fungi of the genus *Microsporum* and *Tricophyton*. Of these, 12 (8.0%) dogs were positive for *L. chagasi* and three (2.0%) for *T. caninum*. Demodectic or sarcoptic mange were detected by skin scrapings or tape in 11 (7.3%) dogs. One (0.7%) of the dogs with *Demodex* sp. was positive for *L. chagasi*.

Results from the histopathological analysis of the skin of the three dogs infected with *T. caninum* revealed a pattern of mild lymphoplasmacytic perivascular infiltrate (Figure 1). Among these dogs, two (1.3%) did not presented clinical changes and in the other dog that had the dermatological findings (0.7%) was observed acanthosis, orthokeratose epidermal

discrete hyperkeratosis, and melanomacrophagous in the dermis. The following findings were observed in the skin analysis of the 15 dogs infected with *L. chagasi*: perivascular dermatitis with lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate of varying intensity (n = 4, 26.6%), lymphohistioplasmocytic perivascular dermatitis of variable intensity (n = 2, 13.3%) and dermatitis that was associated with two inflammatory patterns in the same cut (n = 4, 26.7%), perivascular / perianexial dermatitis with moderate inflammatory lymphohistioplasmocytic infiltrate (n = 2, 13.3%), perivascular dermatitis/mild piogranulomatous perianexial (n = 1, 6.7%), perivascular/perifollicular lesion with moderate inflammatory lymphohistioplasmocytic infiltrate with presence of amastigotes (n = 1, 6.7%) (Figure 2). In three dogs (20%), no histopathological alterations were observed. In one dog, the changes suggested an endocrinopathy characterized by acanthosis, orthokeratotic hyperkeratosis of the epidermis, follicular infundibulum, and atrophy of the hair follicles and sebaceous glands.

4. Discussion

In this study, there was performed in an endemic area, the infection of 2% and 8% of dogs with *T. caninum* and *L. chagasi* infections, respectively, agrees with data obtained by other authors (Gasparetto et al., 2013; Pinto et al., 2014). Infections by different protozoa of the Trypanosomatidae family of canines have been described (Nwoha, 2013). In this scenario, an *L. chagasi* infection has important public health implications (Madeira et al., 2006) due to the relevance of the dog as reservoir. The recent isolation of *T. caninum* from the skin samples of dogs in areas endemic for visceral leishmaniasis has called attention to this protozoan (Barros et al., 2012; Oliveira et al., 2015).

In addition, *T. caninum* infection was identified only in a skin sample, even with the use of a parasitological culture and molecular analysis of blood samples from all the animals (Silva et al., 2004; Pinto et al., 2004). However, the skin was also the biological sample with

the highest detection rate of *L. chagasi*, independent of the target gene sequences used. Despite the low number of positive dogs, these results reinforce the finding that a *T. caninum* infection is restricted to the skin (Madeira et al., 2014). Given the importance of dogs in the epidemiology of this disease, it also reinforces the importance of promoting the distinction of the infectious agent causing the visceral leishmaniasis and the high parasitic load of *L. chagasi* amastigotes on the skin, even in asymptomatic dogs (Barros et al., 2012).

Although the 18S rDNA gene detects *Leishmania* DNA, the use of the primers with a conserved region of *L. chagasi* kinetoplast (kDNA) DNA employed in this research, obtained a higher positivity for this region, which makes it a good diagnostic method for visceral leishmaniasis, especially in endemic and sympatric areas. These results are consistent with those obtained by Pinto et al. (2014). In addition to the low sensitivity already described in other studies (Almeida et al., 2011), the circulation of the two agents was confirmed in the studied population (Madeira et al., 2014; Pinto et al., 2014).

In this study, no association with age, race, and sex was found for *T. caninum* and *L. chagasi* infection, which is similar to the results obtained by other authors studying canine visceral leishmaniasis (Almeida et al., 2009; Oliveira et al. 2009). Although studies have been carried out to investigate the factors associated with a *L. chagasi* infection, there are still no similar studies for a *T. caninum* infection. It results from studies of healthy dogs, between three and five years of age have been reported (Oliveira et al. 2015). However, the data obtained should be analyzed with caution because of the low number of positive dogs.

Dermatological changes are frequently reported in *L. chagasi* infections in canines (Saridomichelakis, 2012). In this study, the main dermatological signs in dogs that were positive for this agent were alopecia, desquamation, pruritus, skin ulcers, and onychogriphosis. These findings are consistent with those of other authors (Almeida et al. 2009; Solano-

Gallego et al., 2009). However, asymptomatic dogs can be found in a high prevalence (Barros et al., 2012), such as observed in this research.

The isolation and detection of *T. caninum* DNA exclusively in intact skin has been considered a peculiar aspect of this agent (Madeira et al., 2014). According to Alves et al. (2012), *T. caninum* can provoke an insufficient mild humoral response to cause clinical lesions; however, no significant histopathological changes related to this infection have yet been described. In this study, just one of the dogs that was positive for *T. caninum* infection presented with dermatological alterations. The clinical picture was characterized by multifocal alopecia, meliceric crusts, and generalized desquamation. However, in the fungal culture (Mattei et al., 2014), was confirmed the coinfection with dermatophytosis, a mycotic disease of keratinized tissues (Nweze, 2011), which causes similar morphological changes as described in this case (Bond, 2010).

The main histopathological change seen in asymptomatic animals with *T. caninum* infection was a mild lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate. However, according to Hargis and Ginn (2007), although mast cells are found abundantly in the dermis, it is also common to find cells such as lymphocytes and plasma cells, in smaller quantities, in healthy tissue. The finding of acanthosis, epidermal orthokeratotic hyperkeratosis, and presence of melanomacrophages in the dermis of the dog with dermatological changes could not be associated with *T. caninum* infection due to the fungal co-infection with *Microsporum* sp. and *Trichophyton* sp, which produce similar changes (Bond, 2010).

Histopathological changes consistent with dermatitis have been described in canine visceral leishmaniasis (De Queiroz et al., 2011). Perivascular and perifollicular changes are the most common, even in the absence of the amastigote forms of *Leishmania* sp. However, similar to that obtained in this study, chronic dermatitis, which is comprised of mononuclear cells such as plasma cells, macrophages and lymphocytes, are also found in dogs with and

without visceral leishmaniasis and in the presence or absence of amastigotes (Figueiredo et al., 2010). The presence of mild lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate that is commonly found in healthy tissue was also observed in dogs with leishmaniasis without clinical symptoms as well as in dogs infected with *T. caninum*. However, in animals with visceral leishmaniasis, an asymptomatic infection may persist for years before the development of clinical symptoms (Baneth et al., 2008); whereas, in a *T. caninum* infection, it is not yet known what the incubation period is or if this parasite is capable of producing clinical signs in infected dogs throughout the course of the disease. The presence of more than one inflammatory pattern, mixed inflammatory patterns, or an overlapping of histological patterns can be observed in *L. chagasi* infections in dogs (Neto et al., 2008). Since canine visceral leishmaniasis could cause a diversity of clinical and histological manifestations, usually a mild or marked inflammatory infiltrate, depending on host resistance variations (Calabrese et al., 2010), this fact may also be associated with cutaneous infections and concomitant diseases (Gross et al., 2005), such as the dermatophytic fungal infection that was observed in 64.7% of positive dogs in this study or hypothyroidism, where the characteristics were more suggestive of atrophic dermatoses than of parasitic dermatoses.

5. Conclusion

The presence of nonspecific changes found in the histology of dogs with and without dermatopathies leads us to infer that *T. caninum* may not induce a cutaneous inflammatory reaction; however, more studies are necessary to better characterize the clinical and histological changes induced by this agent.

Acknowledgements

The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Brasil for financial support.

References

- Almeida, A.B.P.F., Faria, R.P., Pimentel, M.F.A., Dahroug, M.A.A., Turbino, N.C.M.R., Sousa, V.R.F., 2009. Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42,156–159. Doi: 10.1590/S0037-86822009000200012
- Almeida, A.B.P.F., Mendonça, A.J., Sousa, V.R.F., 2010. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Cienc. Rural.* 40,1610–1615.
- Almeida, A.B.F., Sousa, V.R.F., Boa-Sorte, E.C., Figueiredo, F.B., De Paula, D.A.J., Pimentel, M.F.A., Dutra, V., Madeira, M. F., 2011. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11,1555–1560. Doi: 10.1089/vbz.2011.0723.
- Alves, A.S., Mouta-Confort, E., Figueiredo, F.B., Oliveira, R.V.C., Schubach, A.O., Madeira, M.D.F., 2012. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Res. Vet. Sci.* 93,1329-1333. Doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.006
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24, 324–330.
- Barros, J.H.S., Almeida, A.B.P.F., Figueiredo, F.B., Sousa, V.R.F., Fagundes, A., Pinto, A.G.D.S., Baptista, C., Madeira, M. F., 2012. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas

300 overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis
 301 control? T. Roy. Soc. Trop. Med. H. 106,419-423. Doi: 10.1016/j.trstmh.2012.03.014
 302 Bond, R., 2010. Superficial Veterinary Mycoses. Clinics in Dermatology. 2,226-236.
 303 Calabrese, K.S., Cortada, V.M., Dorval, M.E., Souza Lima, M.A., Oshiro, E.T., Souza,
 304 C.S.F., Silva-Almeida, M., Carvalho, L.O.P., Gonçalves Da Costa, S.C., Abreu-Silva, A.L.,
 305 2010. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: Histopathological aspects of the skin in
 306 naturally infected dogs in two endemic areas. Exp. Parasitol. 124,253-257.Doi:
 307 10.1016/j.exppara.2009.10.005
 308 Cardoso, M.J.L., Machado, L.H.A., Melussi, M., 2011. Dermatopatias em cães: revisão de
 309 257 casos. Arch Vet Sci. 16,66-74.
 310 De Queiroz, N.M.G.P., da Silveira, R.C.V., de Noronha, A.C.F., Oliveira, T.M.F.S.,
 311 Machado, R.Z., Starke-Buzetti, W.A., 2011. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine
 312 skin. Vet. Parasitol. 178(1),1-8. Doi: 10.1016/j.vetpar.2010.12.033
 313 Figueiredo, M.M., Moura, E.P., Costa, M.M., Ribeiro, V.M., Michalick, M.S., Tafuri, W.L.,
 314 Figueiredo, M. M., Costa, M. M., Perlatto Moura, E., Ribeiro, V. M., Michalick, M. S.,
 315 Tafuri, W. L., 2010. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin
 316 of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Histol.
 317 Histopathol. 25, 877-887.
 318 Gasparetto, N.D., Trevisan, Y.P.A., Almeida, N.B., Neves, R.C.M., Ameida, A.B.P.F., Dutra,
 319 V., Colodel, E.M., Sousa, V.R.F., 2013. Prevalência das doenças de pele não neoplásicas em
 320 cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. Pesq. Vet. Bras. 33(3),359-362.
 321 Ginn, P.E., Mansel, J.E.K.L., Rakich, P.M., 1972. Skin and appendages. In: Maxie, M.G.
 322 (Org.), Hoare, C.A. (Eds) The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. J Small
 323 Anim Pract, pp. 671-672.

- 324 Gross, T.L., Ihrke, P.J., Walder, E.J., Affolter, V.K, (2 Ed), 2005. Skin diseases of the dog
325 and cat. Clinical and histopathologic diagnosis. Ames, Blackwell Science, 944 pp.
- 326 Hargis, A.M., Ginn, P.E., 2007. The integument. In: McGavin, M.D., Zachary, J.F. (Eds),
327 Pathologic basis of veterinary disease. Mosby, St Louis, pp.1107-1261.
- 328 Hoare, C.A. (Ed), 1972. Herpetosoma from man and other mammals. The trypanosomes of
329 Mammals: A Zoological Monograph. Blackwell Scientific. pp.288-314.
- 330 Keenan, L.D., 2007. Micoses superficiais – Dermatofitoses. Revista Nosso Clínico. 10(57), 6-
331 13.
- 332 Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P.,
333 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection on canine visceral
334 leishmaniasis. J. Clin. Microbiol. 40,210–5. Doi: 10.1128/JCM.40.1.210-215.2002
- 335 Madeira, M., Schubach, A.D.O., Schubach, T.M., Pereira, S.A., Figueiredo, F.B., Baptista, C.,
336 Leal, C.A., Melo, C.X., Confort, E. M., Marzochi, M.C.A, 2006. Post mortem parasitological
337 evaluation of dogs seroreactive for Leishmania from Rio de Janeiro, Brazil. Vet. Parasitol.
338 138(3): 366-370. Doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.059
- 339 Madeira, M.F., Sousa, M.A., Barros, J.H., Figueiredo, F.B., Fagundes, A., Schubach, A.,
340 Paula, C.C., Faissal, B.N.S., Fonseca, T.S., Thoma, H.K., Marzochi, M.C.A., 2009.
341 *Trypanosoma caninum* n. sp.(Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic
342 dog (Canis familiaris) captured in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitology. 136,411-423. Doi:
343 10.1017/S003118200900554X
- 344 Madeira, M.F., Almeida, A.B.P.F., Barros, J.H., Oliveira, T.S., Sousa, V.R., Alves, A.S.,
345 Miranda, L.F.C., Schuback, A.O., Marzochi, M.C.A., 2014. *Trypanosoma caninum*, a new
346 parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. J. Parasitol. 100,231–234.
347 Doi: 10.1645/13-297.1

- 348 Madeira, M.D.F., 2015. Report of new cases of *Trypanosoma caninum* in Brazil. Rev. Soc.
 349 Bras. Med. Trop. 48(3): 347-349. Doi: 10.1590/0037-8682-0307-2014
- 350 Mattei, A.S., Madrid, I.M., Santin, R., Damé Schuch, L.F., Meireles, M.C.A., 2014. Presença
 351 de fungos com potencial patogênico em instrumentos de tosa. Arch. Vet. Sci. 19. Doi:
 352 10.5380/avs.v19i2.32998
- 353 Neto, R.T., Rodrigues, M.M., Amorim, R.L., Conceição, L.G., Luvizotto, M.C.R., Franco,
 354 S.R., 2008. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães
 355 com leishmaniose. Semin. Cienc. Agrar. 29(3), 667-676.
- 356 Nweze, E.I., 2011. Dermatophytoses in domestic animals. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.
 357 (53),95-99.
- 358 Nwoha, R.I.O., 2013. A review on trypanosomiasis in dogs and cats. Afr. J. Biotechnol.
 359 12,6432-6442. Doi: 10.1016/j.clindermatol.2009.12.012.
- 360 Oliveira, L.C.P.D., Araújo, R.R.D., Alves, C.R., Mouta-Confort, E., López, J.A., Mendonça-
 361 Lima, F.W.D., 2009. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the
 362 endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 43(4), 400-
 363 404. Doi: 10.1590/S0037-86822010000400013
- 364 Oliveira, T.D.S.F.D., Barros, J.H.S., Perez, T.D., Figueiredo, F.B., Júnior, A.A.V.M.,
 365 Madeira, M.D.F., 2015. Report of new cases of *Trypanosoma caninum* in Brazil. Rev. Soc.
 366 Bras. Med. Trop. 48(3), 347-349. Doi: 10.1590/0037-8682-0307-2014
- 367 Pereira, D.T., Castro, L.J.M., Centenaro, V.B., Amaral, A.S., Krause, A., Schmidt, C., 2015.
 368 Skin impression with acetate tape in *Demodex canis* and *Sarcoptes scabiei* var. vulpes
 369 diagnosis. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 67,49-54. Doi: 10.1590/1678-6869
- 370 Pinto, A.G.S., Toma, H.K., Figueiredo, F.B., Madeira, M.D.F., 2014. Evaluation of 18S
 371 rDNA PCR assay using skin fragments as a diagnostic test for *Trypanosoma caninum*. Vet.
 372 Parasitol. 205,343–346. Doi: 10.1016/j.vetpar.2014.07.028

- 373 Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., (Ed), 1992. Laboratory Methods in Histotechnology,
374 Washington, DC American Registry of Pathology, 279 pp.
- 375 Sambrook, J., Russell, D.W., (3 Ed), 2001. Molecular Cloning A Laboratory Manual. New
376 York, Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 6.4 - 6.11.
- 377 Saridomichelakis, M.N., (3 Ed), 2012. An approach to erosions and ulcerations. In: Jackson,
378 H., Marsella, R., BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology. Gloucester, BSAVA,
379 pp. 57–64.
- 380 Scott, D.W., Miller, D.H., Griffin, C.E., (6 Ed), 2001. Muller and Kirk's - Small Animal
381 Dermatology. Philadelphia, Saunders, 1528 pp.
- 382 Smith A, Clark P, Averis S, Lymbery AJ, Wayne AF, Morris KD, Thompson, R. C. A., 2008.
383 Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed
384 Bettongia penicillata (Marsupialia: Potoroidae). Parasitol. 135,1329-1335. Doi:
385 10.1017/S0031182008004824
- 386 Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau,
387 P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and
388 prevention of canine leishmaniosis. Vet. Parasitol. 165,1-18. Doi:
389 10.1016/j.vetpar.2009.05.022
- 390 Souza, T.M., Figuera, R.A., Schmidt, C., Réquia, A.H., Brum, J.S., Martins, T.B., Barros,
391 C.S.L., 2009. Prevalência das dermatopatias não-tumorais em cães do município de Santa
392 Maria, Rio Grande do Sul (2005-2008). Pesq. Vet. Bras. 29(2),157-162. Doi: 10.1590/S0100-
393 736X2009000200013
- 394
- 395

Table 1. Positivity to *Trypanosoma caninum* and *Leishmania chagasi* in blood and skin samples in molecular analysis using the 18S rDNA and *Leishmania* kDNA targets.

Agente	Dogs				
	n = 150	18S rDNA		kDNA	
		Positive	Blood	Skin	Blood
<i>T. caninum</i>	3	0	3	0	0
<i>L. chagasi</i>	15	1	5	7	6
Total	18	1	8	7	6

420 Table 2. Univariate and multivariate analysis of the factors associated with *Trypanosoma*
 421 *caninum* and *Leishmania chagasi* infection in the 150 dogs surveyed.

Variables	<i>Trypanosoma caninum</i>			<i>Leishmania chagasi</i>		
	n (%)	Univariate	Multivariate	n (%)	Univariate	Multivariate
		P	P		P	P
		OR (IC95)			OR (IC95)	
Gender						
Male (n=64)	02(1.3)	0.3 0.3 (0.1-2.2)	0.3	05(3.3)	0.4 1.5 (0.5-7.4)	0.4
Female (n=86)	01(0.7)			10(6.7)		
Breed						
Mixed (n=73)	02(1.3)	0.4 2.1 (0.3-5.6)	0.5	09(6)	0.3 1.6 (0.5-6.4)	0.3
Pure (n=77)	01(0.7)			06(4)		
Age						
Indefinite age (n=24)	02(1.3)	0.1 ----	0.1	03(2.0)	0.7	0.8
< 1 (n=13)	00(0.0)			02(1.3)		
1-5 (n=69)	00(0.0)			07(4.7)		
5-10 (n=38)	01(0.7)			03(2.0)		
>10 (n=06)	00(0.0)			00(0.0)		
Dermatopathies						
Yes (n=117)	01(0.7)	0.1 7.4 (1.3-19.8)	0.06	12(8.0)	0.5 0.8 (0.2-3.0)	0.8
No (n=33)	02(1.3)			03(2.0)		

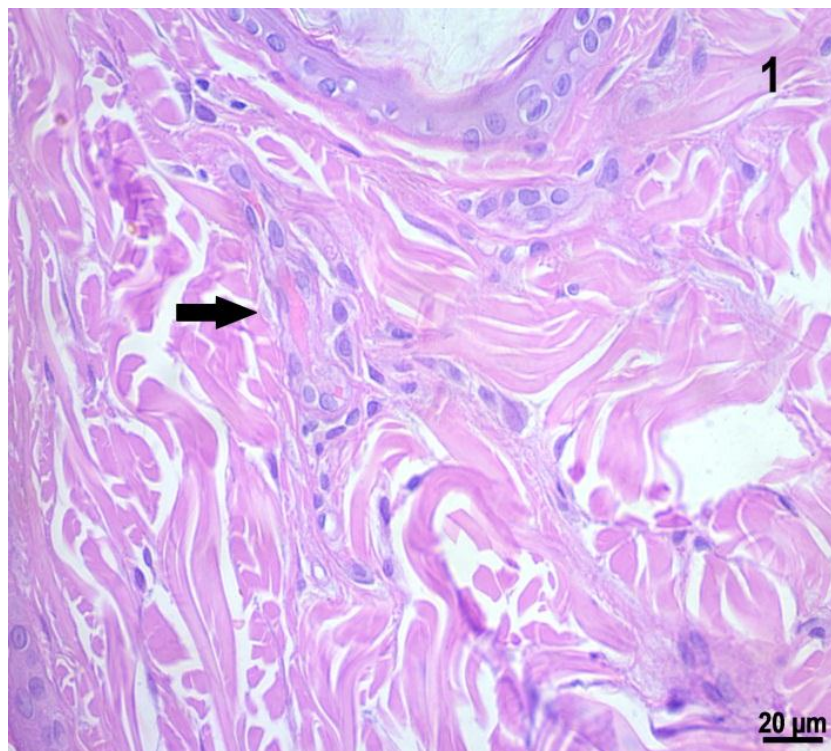
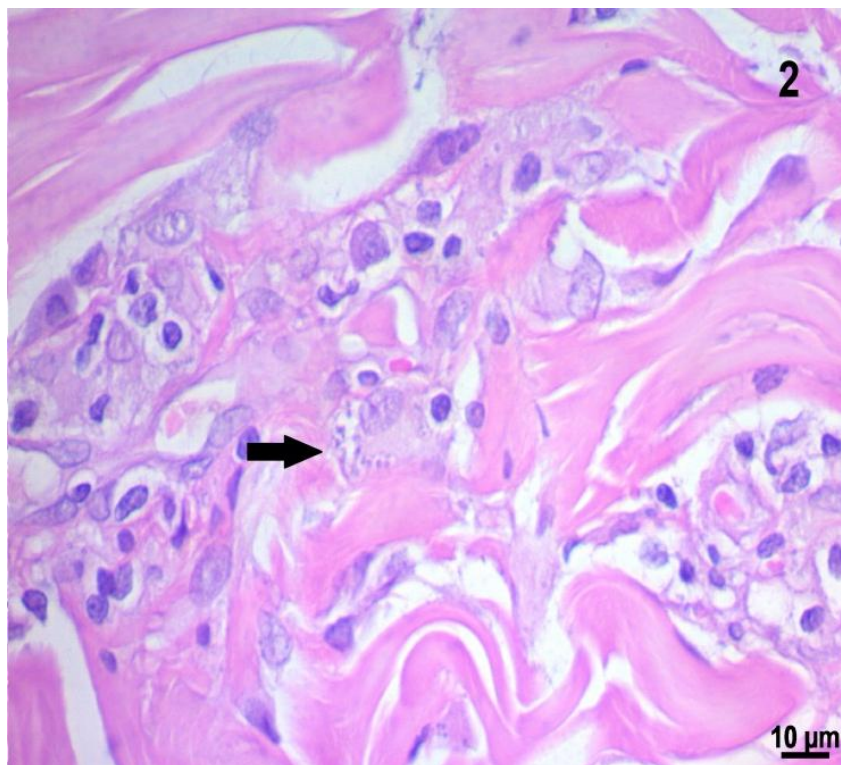


Figure 1: Photomicroscopy of the dermis of a dog with *T. caninum* infection presenting lymphoplasmacytic perivascular inflammatory infiltrate (arrow). (HE).



437

438 Figure 2: Photomicroscopy of the dermis of a dog with *L. chagasi* infection presenting

439 perivascular and perifollicular infiltrate, lymphohistioplasmocitary, and amastigotes of

440 *Leishmania* sp (arrow). (HE).

441

442

1. Ficha de Avaliação dos Pacientes

	Universidade Federal de Mato Grosso Hospital Veterinário-HOVET Laboratório de Leishmanioses Ficha de Exame Dermatológico
---	---

NOME:..... Raça:..... Idade:.....
 NPP:.....

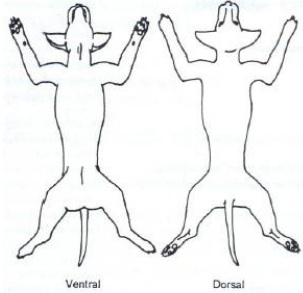
Sexo: () macho () fêmea () castrado () inteiro	
Procedência:	
Cor da pelagem:	Tipo de pelo: curto () médio () Longo ()
Estado nutricional: () obeso () bom () regular () ruim () caquético	

1- Características clínicas das lesões

Perda de pelos () sem () com () hipotricose () alopecia	
Descamação () sem () com () localizada () generalizada	
prurido () sem () com () localizado () generalizado	
() perene () sazonal → () período de chuvas () período de seca	
Espessura () fina () normal () espessa	Odor () normal () alterado como:
Elasticidade () normal () alterado () + () -	Oleosidade () normal () alterado () + () -

2- Localização das lesões

Cabeça	pescoço	orelhas	lábio	focinho
membro torácico	membro pélvico	coxins	unhas	interdigital
tórax	abdômen	dorso	períneo	cauda
escroto	disseminada	Outro local: qual?		
Dados clínicos adicionais:				



Ventral Dorsal

Evolução das lesões () horas () dias () semanas () meses () anos quanto?

3- Aspecto macroscópico das lesões

Pápulas	pústulas	vesículas	bolhas	urticas	fissuras	erosões/úlceras
hiperpigmentação	hipopigmentação	máculas	manchas	colaretes epidérmicos		
comedões	cilindros foliculares	liquenificação	eritema	fístulas	crostas	
nódulos	placas	massas	Vegetações	cistos	Seios	
cicatrices	cornos	tumefação	Calos	Outro: qual?		

4- SUSPEITA CLÍNICA:

5- Exames de apoio realizados

() parasitológico	() bacteriológico	() citopatológico	() testes hormonais
() micológico	() tricograma	() histopatológico	() testes cutâneos intradérmicos
Exame Wood: Positivo () Negativo ()			
Resultados obtidos:			
Tratamentos realizados:			
Resultado:			

Diagnóstico clínico:	
Médico Veterinário:	Data:
Endereço:	
Telefone:	E-mail:

2. Avaliação Capes da Revista Veterinary Parasitology

Periódicos Qualis

Dados para Consulta

*Evento de Classificação:

Qualis 2014

Área de Avaliação



-- SELECIONE --



ISSN:



Título:



veterinary parasitology

Classificação:



-- SELECIONE --

Consultar

Cancelar

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1873-2550	VETERINARY PARASITOLOGY (ONLINE)	MEDICINA VETERINÁRIA	A2

a. Comprovante de Submissão do Artigo

10/02/2017

Elsevier Editorial System™



[Contact us](#)  [Help](#) [?](#)



Maintenance outage on 12 February 2017 [...more](#)
 Scopus access for Editors and Reviewers [...more](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: arleferreira@gmail.com
 Switch To: [Author](#) ▼ Go to: [My EES Hub](#)

Submissions Being Processed for Author Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida Almeida

Page: 1 of 1 (1 total submissions)
 Display results per page

 Action 	 Manuscript Number 	 Title 	 Initial Date of Submission 
Action Links		Prevalence and clinical and histological changes in the skin diseases associated with <i>Trypanosoma caninum</i> and <i>Leishmania chagasi</i> infection in domestic dogs	10 Feb 2017

Page: 1 of 1 (1 total submissions)
 Display results per page

----- Forwarded message -----

From: **VETPAR** <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Date: 2017-02-10 8:56 GMT-03:00

Subject: Submission Confirmation for Veterinary Parasitology

To: arleferreira@gmail.com

Title: Prevalence and clinical and histological changes in the skin diseases associated with Trypanosoma caninum and Leishmania chagasi infection in domestic dogs
Research paper

Dear Professor Almeida,

Your submission has been received by the journal
Veterinary Parasitology.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<https://ees.elsevier.com/vetpar/>

Your username is: arleferreira@gmail.com

Your password is: *****

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Veterinary Parasitology

For further assistance, please visit our customer support site at
<http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.102289/2015-92, sobre “Avaliação dermatológica de cães domésticos com foco na infecção por *Trypanosoma caninum*”, sob a responsabilidade de **Profª Drª ARLEANA DO BOM PARTO FERREIRA DE ALMEIDA**/Herica Makino & Col., está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **10/12/2015**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.102289/2015-92, entitled “Dermatologic evaluation of domestic dogs focusing on *Trypanosoma caninum*”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **Dec 10, 2015**.

Cuiabá-MT, 11 de dezembro de 2015.


Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente


Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Vice-Presidente

Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT
Cidade Universitária – Av. Fernando Correa da Costa, 2.367
Bairro Boa Esperança – CEP 78060-900 – CUIABÁ-MT, Brasil.

Telefone: (65) 3615 8829
Fax.: (65) 3615 8254
E-mail: cepa@ufmt.br