

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MARIANA SIGNORI OTTO

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM PORQUINHO-DA-ÍNDIA (*CAVIA
PORCELLUS*): RELATO DE CASO**

**REALEZA
2024**

MARIANA SIGNORI OTTO

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM PORQUINHO-DA-ÍNDIA (*CAVIA
PORCELLUS*): RELATO DE CASO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Prof. Dr^a. Fabiana Elias

REALEZA

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Otto, Mariana Signori

Leishmaniose tegumentar em porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*): Relato de caso / Mariana Signori Otto. -- 2024.

7 f.:il.

Orientadora: Doutora Fabiana Elias

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Medicina Veterinária, Realeza, PR, 2024.

1. citologia. 2. *Leishmania enriettii*. 3. imunohistoquímica. 4. parasitologia. 5. PCR. I. Elias, Fabiana, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MARIANA SIGNORI OTTO

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM PORQUINHO-DA-ÍNDIA (*CAVIA
PORCELLUS*):
RELATO DE CASO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 18/10/2024.

BANCA EXAMINADORA

Fabiana Elias

Prof.^a Dr.^a Fabiana Elias – UFFS

Orientadora

Documento assinado digitalmente
gov.br EMANUEL CAON
Data: 30/10/2024 16:48:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mv. Emanuel Caon – UFFS

Documento assinado digitalmente
gov.br JONATAS CATTELAM
Data: 01/11/2024 08:04:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jonatas Cattellam – UFFS

Dedico este trabalho

A minha tia Nina, que ausente em corpo, se faz presente em alma; aos meus pais, Rosani e Elson, pelo amor, paciência e incondicional apoio; aos amigos, por tornarem o difícil, divertido; aos meus mestres, por me ensinarem os caminhos da profissão que para mim sempre será a mais linda de todas; a todos os animais, grandes e miúdos, peludos, escamados e penados, que correm, rastejam, voam, pelo céu, terra e águas, por serem a paixão de uma vida e motivo de tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, por ser meu porto seguro mesmo a 400 km de distância, por entender a minha necessidade de ajuda quando eu mesma tantas vezes não percebi; por relevar minhas criancices e por me ensinar o que é amor incondicional. Eu jamais seria capaz de escrever palavras dignas da tua importância, mãe, obrigada por ser melhor do que eu poderia esperar, e mais do que mereço. Obrigada pai, a responsabilidade e dedicação com que você construiu sua vida são exemplos para a minha. Você viabilizou meu sonho, carreira e minha vida, espero um dia poder de alguma forma retribuir tudo isso. Agradeço às minhas tias-mães, pelas orações e eu te amos, por me fazerem sentir em casa em tantos lugares, pelo apoio e carinho que recebo desde sempre. Agradeço aos meus filhotes, meus amores, por atravessarem minha vida trazendo tanta felicidade: Tina, Tim, Meia-Noite, Luna, Bethania e Diguinho. Agradeço a todos amigos. Eu me considero muito sortuda por ter tantos que citá-los todos seria desgastante para quem lê. Amigos antigos, obrigada por desde sempre estarem aqui. Aos amigos que Realeza me proporcionou, vocês foram o lado bom de tudo isso. Obrigada por compartilharem comigo vivências e por me fazerem lembrar de que só se vive uma vez. A minha vida com certeza é melhor, mais fácil e divertida compartilhando-a com vocês. Agradeço à Fabiana Elias por ser tão mais que uma professora, serei para sempre sua filhota.

|

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM PORQUINHO-DA-ÍNDIA (*CAVIA PORCELLUS*): RELATO DE CASO

Mariana Signori Otto¹
Fabiana Elias²

RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que podem acometer diversas espécies animais, inclusive o ser humano. Porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) são hospedeiros vertebrados da *Leishmania enriettii*. A transmissão para estes roedores ocorre pela picada da fêmea de um artrópode, sendo os flebotomíneos os mais prováveis vetores. O surto em questão se trata de três casos de leishmaniose tegumentar em porquinhos-da-índia, que foram atendidos na Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU) da Universidade Federal da Fronteira Sul. Clinicamente, os animais apresentavam lesões tegumentares nodulares e crostosas severas, principalmente em região nasal e em pino. Na citologia oriunda da coleta das lesões por meio de punção por agulha fina (PAF), evidenciou-se grande número de macrófagos parasitados, com citoplasma amplo contendo múltiplos vacúolos parasitoides compatíveis com *Leishmania* sp., em sua forma amastigota, de formato ovoide, sendo possível identificar cinetoplasto e núcleo. Dois animais foram submetidos à eutanásia, sendo realizada avaliação anatomopatológica e coleta de amostras dos órgãos para histopatologia e diagnóstico molecular através da imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. Na histopatologia de pele, revelou-se acantose, espessamento da camada granulosa e hiperqueratose para e ortoqueratótica, sendo as lesões constituídas por focos necróticos e de inflamação acentuada e difusa, com predomínio histiocitário, sendo que estes macrófagos residentes apresentaram citoplasma amplo e repleto de formas amastigotas. Os anexos dérmicos foram obliterados pela inflamação. A imunohistoquímica confirmou a presença do parasito na pele; em fígado, em região centrolobular, restos antigênicos foram apenas indicativos da presença do parasito. O teste de PCR foi confirmatório, sendo as bandas de pele e de baço oriundas de amostras de um dos animais acometidos compatíveis com a banda controle de *L. enriettii*. Constituiu-se, portanto, o primeiro relato da presença desta espécie em casos de infecção espontânea na região sudeste do Paraná.

Palavras-chave: citologia; *Leishmania enriettii*; imunohistoquímica; parasitologia.

¹Graduanda do curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza. E-mail: mariana.signoriotto@gmail.com;

²Docente Efetiva do curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza. E-mail: fabiana.elias@uffs.edu.br.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of infectious diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which can affect various animal species, including humans. Guinea pigs (*Cavia porcellus*) are the vertebrate hosts of *Leishmania enriettii*. Transmission to these rodents occurs through the bite of a female invertebrate, with sandflies being the most likely vectors. The outbreak in question involves three cases of cutaneous leishmaniasis in guinea pigs, which were treated at the University Veterinary Hospital Superintendence (SUHVU) of the Universidade Federal da Fronteira Sul. Clinically, the animals presented severe nodular and crusted cutaneous lesions, primarily on the nasal region and ears. Cytology from lesion samples collected by fine-needle aspiration (FNA) revealed a large number of parasitized macrophages with abundant cytoplasm containing multiple vacuoles compatible with *Leishmania* sp. in its amastigote form, ovoid in shape, with identifiable kinetoplast and nucleus. Two animals were euthanized, and histopathological evaluations and organ sample collections for histopathology and molecular diagnosis through immunohistochemistry and conventional polymerase chain reaction (PCR) were conducted. Skin histopathology revealed acanthosis, thickening of the granular layer, and both para- and orthokeratotic hyperkeratosis. The lesions consisted of necrotic foci and marked diffuse inflammation, predominantly histiocytic, with resident macrophages displaying abundant cytoplasm filled with amastigote forms. The skin appendages were obliterated by inflammation. Immunohistochemistry confirmed the presence of the parasite in the skin, while in the liver, antigenic remnants in the centrilobular region were merely indicative of the parasite's presence. The PCR test was confirmatory, with skin and spleen bands from samples of one of the affected animals being compatible with the control band of *L. enriettii*. This is the first report of this subspecies in cases of spontaneous infection in the southeastern region of Paraná.

Keywords: cytology; *Leishmania enriettii*; immunohistochemistry; parasitology.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários difásicos do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). São doenças infecciosas, de evolução crônica, consideradas problema de saúde pública, com incidência em mais de 98 países, incluindo o Brasil. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde, a leishmaniose possui características endêmicas em 99 países. É uma doença fortemente associada a fatores de precariedade social, sendo considerada uma doença tropical negligenciada (OPAS, 2024). São mais de 20 espécies de *Leishmania* capazes de infectar seres humanos, sendo que estimativas apontam que são cerca de 700.000 a 1 milhão de novos casos notificados anualmente, dado este que provavelmente subestima o real impacto causado por estas doenças, devido à subnotificação em países subdesenvolvidos com pouca estrutura de diagnóstico, e dos casos que passam despercebidos por serem assintomáticos, já que nem todos os infectados vêm a desenvolver formas clínicas da doença. Os sinais clínicos da leishmaniose variam desde lesões cutâneas focais de cura espontâneas, lesões mais severas em pele (crostosas, ulcerativas, nodulares) a até mesmo a quadros de doença mucocutânea difusa e acometimento visceral, podendo ser fatal caso não realizado adequado tratamento (OMS, 2024).

As *Leishmanias* têm capacidade de infectar diversos mamíferos, como o porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*). Em porquinhos-da-índia, a leishmaniose foi evidenciada pela primeira vez em Curitiba, no estado do Paraná, no Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas, em 1946, quando pesquisadores perceberam que algumas cobaias que utilizavam em pesquisa apresentavam lesões nodulares nas orelhas e testículos. Foram realizados cortes histológicos das lesões, que, ao exame histopatológico, evidenciaram mesma morfologia e aspecto geral da *Leishmania donovani* (nomenclatura utilizada à época para se referir à *Leishmania infatum*), evidenciando abundante quantidade de macrófagos parasitados, sendo estes achados equivalentes aos de outras leishmanioses cutâneas. Ao realizarem a inoculação em outros animais, conseguiram produzir infecção e lesões de pele similares em extremidades, evidenciando uma disseminação metastática do parasito (Medina, 1946).

A *Leishmania enriettii* (Muniz & Medina, 1946), parasita pertencente ao subgênero Mundinia, é a espécie específica causadora da doença em porquinhos-da-índia. Ainda não há relatos de transmissão e infecção de humanos pela *L. enriettii*. Parasitas deste subgênero possuem plasticidade fenotípica, sendo comprovada sua capacidade de infectar diversas espécies de mamíferos e de causar doença inclusive em seres humanos, produzindo tanto formas cutâneas como viscerais de doença. Contudo, ainda há incerteza em termos dos reservatórios destes parasitas e dos vetores naturais de leishmanioses deste subgênero. A transmissão ocorre através da picada de insetos hematófagos, tendo sido confirmada esta transmissão por flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e mosquitos ceratopogonídeos (Diptera: Ceratopogonidae) como *Culicoides sonorensis* (Becvar *et al.*, 2024; Seblova *et al.*, 2015). No Brasil, foi relatada infecção natural com *Lutzomyia monticola* e *Lutzomyia correalimais* como prováveis vetores (Luz *et al.*, 1967). Diferentemente de outras espécies do subgênero Mundinia, a *L. enrietti* tem a capacidade de infectar os porquinhos-da-índia, sendo estes considerados até o presente momento, seus únicos

hospedeiros domésticos. A cepa L88 tem sido inoculada experimentalmente em cobaias, e é a cepa capaz de promover infecção e lesões nestes animais (Paranaíba, 2014).

As lesões cutâneas causadas por essa espécie de *Leishmania* em porquinhos-da-índia são áreas alopecicas, com ulcerações, geralmente em região de face e extremidades, principalmente nariz e orelhas. Estas lesões, em geral, têm evolução crônica e melhoram progressivamente, curando-se de forma espontânea após algumas semanas, em um processo de cura parasitológica ou de latência do parasito, revertendo-se o quadro clínico. Acredita-se que seja uma espécie dermatrópica, contudo, estudos recentes comprovam que a *L. enriettii* possui a capacidade de assumir forma visceral durante seu ciclo de vida, atingindo órgãos como traqueia, pulmão e baço (Alves-Sobrinho *et al.*, 2022).

Apesar do longo tempo decorrido desde sua descoberta, em 1946, ainda existem questões sobre a *L. enriettii* que não foram elucidadas cientificamente, tanto no que tange às características biológicas do parasito, da relação deste com os hospedeiros e vetor, epidemiologia, imunologia e relações taxonômicas dentro deste subgênero de *Leishmania*. São questões relevantes em nível de saúde pública que precisam de aprofundamento para melhor compreensão e para poder definir de fato todas circunstâncias e riscos relativos à espécie em questão (Paranaíba *et al.*, 2017). O presente estudo objetiva relatar a infecção natural por *L. enriettii* em três porquinhos-da-índia, oriundos do mesmo plantel, e expor dados clínicos, anatomopatológicos, epidemiológicos e moleculares sobre o surto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O diagnóstico citológico, anatomopatológico e histopatológico foi realizado no laboratório de patologia veterinária da SUHVU e o diagnóstico molecular nas dependências do Instituto René Rachou (Fiocruz Minas). Os dados clínicos foram obtidos das requisições dos animais.

As amostras para o exame citológico foram obtidas por meio de coleta das lesões de pele de dois animais que vieram para atendimento clínico, sendo esta por meio de técnica de punção por agulha fina (PAF), sendo o material depositado em lâminas, enviadas para o laboratório de patologia veterinária, sendo posteriormente submetidas à fixação por meio de solução fixadora de triarilmetano e metanol, para posterior coloração em duas soluções corantes, uma composta por xantenos e água deionizada, e a outra composta por tiazinas e água deionizada. Cada lâmina foi imersa por 5 segundos em cada substância, de acordo com o método de coloração Panótico Rápido, baseado no método de coloração hematológica estabelecido por Romanowsky (LABORCLIN, 2019).

Os animais que foram eutanasiados pela gravidade das lesões, foram encaminhados para exame necroscópico pelo médico veterinário responsável. Após a necropsia, fragmentos de tecido da pele, baço, rim, pulmão, e fígado foram fixados em formol 10% por no mínimo 48 horas. Após, o material foi cortado e armazenado em cassetes com parafina, para posterior microtomia, de acordo com a técnica de rotina descrita por Caputo, Gitirana e Manso (2010). As lâminas dos cortes histológicos foram coradas com hematoxilina e eosina para análise por meio de microscopia óptica. Amostras de órgãos também foram armazenadas em microtubos do tipo *Eppendorf* em solução de RNA *latter* e congeladas. Estas amostras foram encaminhadas para o Grupo de Estudos em Leishmaniose do Instituto René Rachou

(Fiocruz Minas) em Belo Horizonte, Minas Gerais, onde foi realizada a técnica de imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.

As amostras utilizadas para identificação da espécie de *Leishmania* foram processadas de acordo com a técnica de PCR convencional descrita por Graça *et al.* (2012). Como alvo para a detecção de DNA de espécies de *Leishmania* foi utilizada uma região específica de 234 pb no gene hsp70, possibilitando a distinção entre diversas espécies do parasito após reação em cadeia da polimerase-polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).

A imunohistoquímica foi realizada de acordo com a técnica descrita por Freire *et al.* (2022), sendo utilizado como anticorpo monoclonal o anti-mTXNPx (mAb), produzido por hibridização somática, com o uso de *Leishmania*-mTXNPx como imunógeno. Para padronização foram utilizadas as enzimas peroxidase de rábano (IHC-HRP) e fosfatase alcalina (IHC-AP). Em relação à coloração da marcação, foi utilizado o sistema de detecção polimérico livre de biotina *Bond Polymer Refine Red Detection* (Leica Microsystems, Newcastle, Reino Unido), um sistema conjugado de anticorpo AP-linker polimérico contendo solução *Fast Red* como substrato cromógeno, que marca o antígeno detectado na cor vermelha.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, um porquinho-da-índia foi trazido para atendimento clínico na SUHVU/ UFFS, pelas lesões tegumentares que apresentava. O animal possuía lesões acentuadas, com formações nodulares crostosas em pina, focinho, em dígitos de todos os membros, espessamento de pina em ambas orelhas, e ulceração em porção da área lesionada (Figura 1). A proprietária afirmou ter percebido lesões semelhantes em outros animais do mesmo plantel, e sendo essas de rápida evolução. Posteriormente, foram trazidos mais dois animais do plantel para atendimento com lesões de mesma característica, variando apenas em número e gravidade. Ribeiro *et al.* (2023) descreveram a presença de lesões crostosas e ulceradas também em focinho, lábio superior, porção distal de membro torácico e pina dos animais. É evidente a predisposição destas porções anatômicas de extremidades como pina, dígitos e focinho ao desenvolvimento de lesões. A região escrotal também é citada como área predisposta (Soccol *et al.*, 2021), neste caso, apenas um dos animais apresentou lesões de pele em escroto. Por serem regiões mais “externas” em relação ao todo do corpo do animal, seriam áreas mais expostas aos vetores. Esta predileção do vetor por realizar a picada nestas porções também pode estar relacionada à temperatura corporal, que tende a ser mais baixa nas extremidades (Ecco *et al.*, 2000).

As lesões podem ter início a partir de uma área de alopecia, onde foi realizada a picada pelo vetor. Pode haver descamação e posterior disseminação da lesão para outras porções da pele. Comumente, ocorre aumento de volume nodular eritematoso e edemaciado, que evolui para um nódulo de aspecto verrucoso, firme e ulcerado, com hemorragia e exsudato serosanguinolento. Ao redor dos dígitos, estas formações nodulares podem culminar em claudicação, pododermatite, lesões traumáticas e fraturas (Soccol *et al.*, 2021).

O incômodo durante a locomoção é evidente, tornando os animais mais prostrados. Um dos animais acometidos no presente estudo, apresentava lesões em todos os dígitos, de diferentes graus, culminando em sinais de anorexia. É comum que ocorra a cicatrização e posterior ressurgimento das lesões após alguns meses. Cronicamente, pode levar a sinais clínicos como epistaxe, espirros e ruídos

respiratórios; neste caso, pode se considerar a presença de infecção em nível visceral. Apesar da “cura espontânea” que ocorre em muitos casos, a grande tendência de retorno dos sinais, e estes por vezes são graves ao ponto de causar o óbito do animal (Soccol *et al.*, 2021).

Figura 1 – Macroscopia das lesões causadas por *L. enriettii* em *C. porcellus*. 1A: Pina direita, lesão de aspecto irregular, nodular e crostoso. 1B: Plano nasal e lábio inferior, lesões nodulares ulceradas. 1C: Pina esquerda, lesão de aspecto irregular, nodular e crostoso. 1D: Dígitos, áreas de alopecia e aumentos de volume nodulares.



Fonte: fotografia registrada pelo autor (2023).

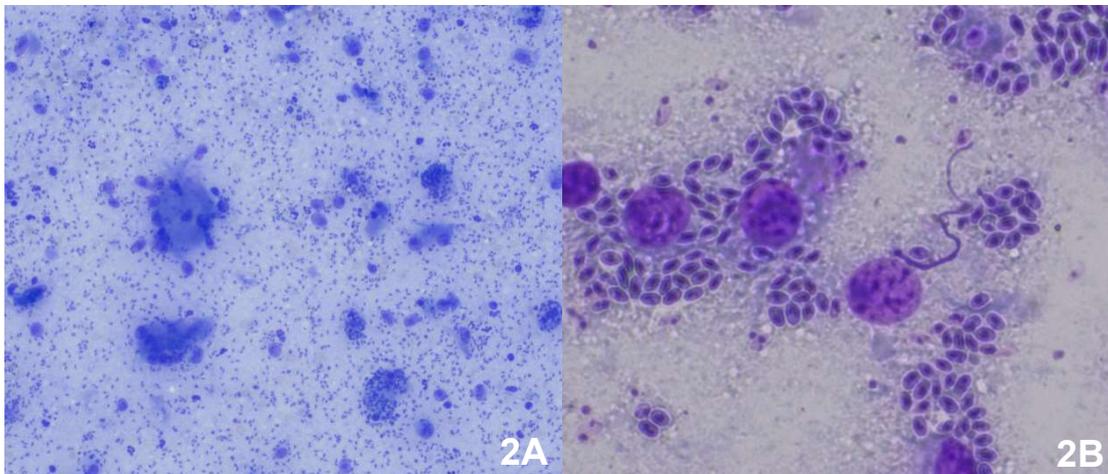
Os casos de leishmaniose aqui relatados foram diagnosticados inicialmente através de exame citopatológico. Na citologia, as amostras apresentaram acentuada quantidade de macrófagos com alta presença de estruturas pequenas, redondas a ovaladas, com um núcleo escuro bem definido, arredondado e cinetoplasto levemente alongado, compatíveis com as formas amastigotas (Figura 2A) (Akhoundi *et al.*, 2016). Essas também se apresentaram livres, em alta quantidade no espaço extracelular. Foram visualizadas células multinucleadas com citoplasma repleto pelas amastigotas, além de fundo de lâmina com alta presença de polimorfonucleares hipersegmentados. Esses achados citopatológicos condizem com os achados de Ribeiro *et al.* (2023),

também caracterizados por numerosos macrófagos, com citoplasma amplo e espumoso preenchidos pelos vacúolos parasitóforos ovais contendo amastigotas.

O infiltrado inflamatório em manifestações clínicas envolvendo *Leishmania* sp. é granulomatoso. Um granuloma caracteriza-se morfológicamente pela presença de células epitelioides (Figura 2B) e aparência concêntrica de lesão, sendo uma agregação organizada de macrófagos e outras células imunes em resposta a um estímulo persistente, como o causado por agentes infecciosos. Nas leishmanioses, ocorre o chamado granuloma de alta renovação, no qual agente causador é tóxico para os macrófagos, levando à morte celular e recrutamento de novas células. Persistindo o estímulo imunológico causado pelo patógeno, perpetua-se o ciclo. Os granulomas são sobretudo uma tentativa de proteger o hospedeiro, e através da fagocitose que realizam, isolar a infecção. Entretanto, em diversas doenças parasitárias, como é o caso da leishmaniose, a própria reação inflamatória é muitas vezes responsável pela reatividade tecidual e lesões extensas. Respostas granulomatosas podem definir o desfecho da doença através da erradicação ou a persistência do parasita. Para parasitas do gênero *Leishmania*, a inflamação granulomatosa desempenha um papel na transmissão contínua, e impacta seu ciclo de vida (Giorgio *et al.*, 2020).

Figura 2A: *C. porcellus*, pele, intenso infiltrado histiocitário, numerosas amastigotas intracitoplasmáticas, punção por agulha fina (PAF). Panótico Rápido. 40x.

2B: *C. porcellus*, pele, presença de células gigantes multinucleadas, intensa presença amastigotas tanto intra como extracelulares, punção por agulha fina (PAF). Panótico Rápido. 10x.

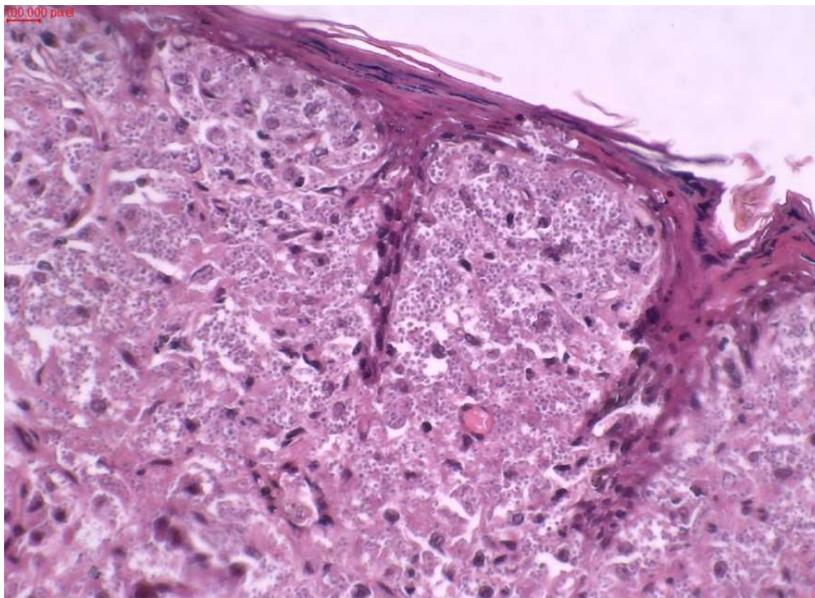


Fonte: fotografia registrada pelo autor (2023).

Na histopatologia das amostras de pele, houve espessamento irregular por aumento de células da camada espinhosa (acantose), espessamento da camada granulosa, hiperqueratose paraqueratótica e ortoqueratótica. Também houve formação de crostas com extenso infiltrado inflamatório e exsudato. Em derme, extenso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear histiocítico, havendo presença de células gigantes multinucleadas. Ausência de anexos na derme, que foram obliterados pela inflamação. O infiltrado inflamatório era difuso e misto, havendo escassos linfócitos de permeio. Os histiócitos (macrófagos residentes) apresentam citoplasmas amplos, preenchidos por numerosas amastigotas. Em determinados

focos, havia presença dessas amastigotas dentro da epiderme (Figura 3). Em áreas mais profundas, presença de colágeno e fibroblastos. Tais achados são similares aos descritos por Ecco *et al.* (2000), em relação ao infiltrado inflamatório histiocítico difuso e acentuado em derme, além da presença esporádica de linfócitos e fibroplasia. Os mesmos autores também relataram a presença de células gigantes multinucleadas. Do mesmo modo, Machado *et al.* (1994) e Rosa *et al.* (2020) relataram infecção na mesma espécie caracterizada por infiltrado inflamatório composto por plasmócitos e linfócitos, áreas de necrose e ulceração, além das abundantes formas amastigotas intracitoplasmáticas. Nos demais tecidos não foram encontrados amastigotas.

Figura 3: *C. porcellus*, pele, difuso infiltrado inflamatório misto, predominantemente histiocitário e com escassos linfócitos de permeio. Em determinados focos, há presença de amastigotas dentro da epiderme. HE, 40x.



Fonte: fotografia registrada pelo autor (2023).

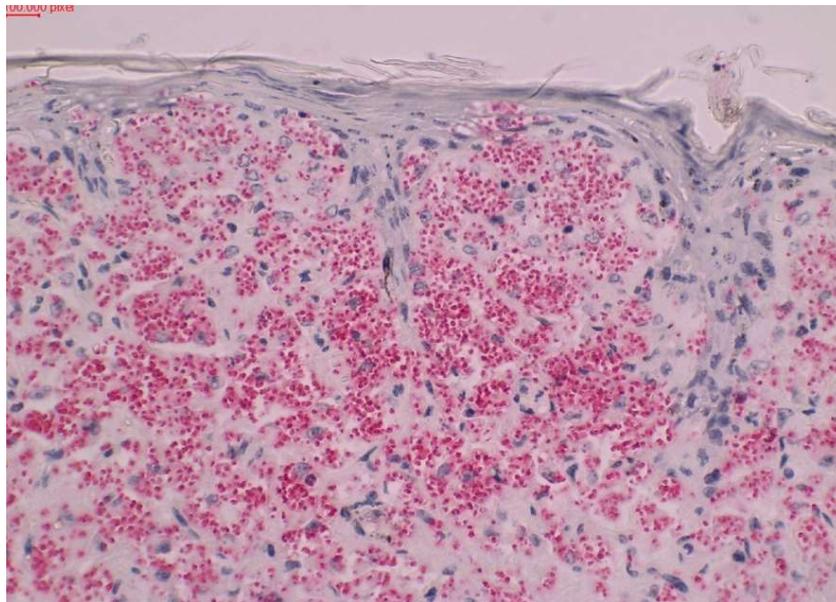
Alves-Sobrinho *et al.* (2022) comprovaram infecção por *L. enriettii* em traqueia e pulmões, constituindo o primeiro relato do acometimento destes órgãos pelo parasito. Isso demonstra a capacidade de visceralização durante seu ciclo de vida, rompendo com a dicotomia de definições sobre a leishmaniose ser ou mucocutânea, ou visceral. Esta distinção de formas de doença, tratando-se de casos em animais, geralmente não se aplica, pois são frequentes os relatos de lesões tanto mucocutâneas como viscerais em um mesmo caso, sendo que a evolução clínica da doença varia muito conforme seu portador. Posteriormente, Ribeiro *et al.* (2023) relataram acometimento pulmonar causado pela *L. enriettii*, descrevendo alterações de pneumonia broncointersticial e, pela primeira vez, uma lesão granulomatosa focal em pulmão associada à presença do parasito.

A imunohistoquímica foi realizada usando anticorpo monoclonal anti-mTXNPx (mAb), que foi produzido a partir do imunógeno Leishmania–mTXNPx recombinante, sendo testada sua viabilidade para marcação de amastigotas padronizada através de amostras positivas para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. O mAb revelou marcação positiva para as amastigotas de *Leishmania* acentuadamente em derme, e em porções de epiderme (Figura 4). Em fígado, arquitetura lobular preservada e discreto infiltrado inflamatório linfocitário nos tratos portais. Não foram

observadas amastigotas típicas no fígado. Entretanto, ao redor de algumas veias centrolobulares, foram observadas estruturas interpretadas como “restos antigênicos”.

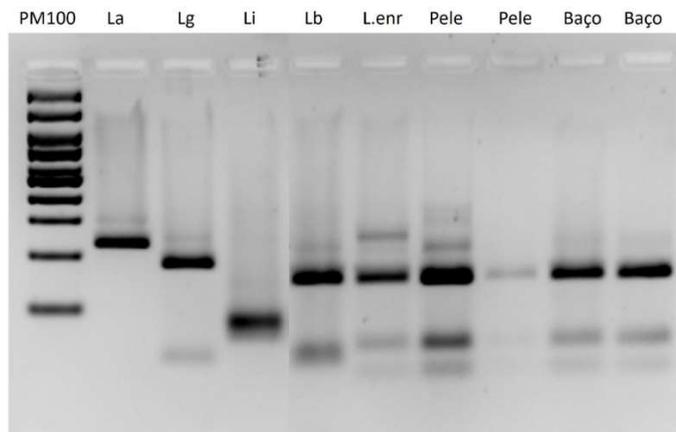
Para confirmação da espécie de *Leishmania* envolvida no surto, foi realizado o diagnóstico molecular através do teste da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, sendo este confirmatório para *L. enriettii*. Foram comparadas as bandas oriundas das amostras de pele e de baço de um dos animais acometidos com bandas controle de amplificações de DNA oriundos de *L. enriettii*, *L. amazonensis*, *L. guayanensis*, e *L. infantum*. O comprimento da banda amplificada a partir das amostras do caso foram compatíveis com a banda controle de *L. enriettii* (Figura 5).

Figura 4: *C. porcellus*, pele, marcação positiva para amastigotas de *Leishmania* sp. através de anti-mTXNPx (mAb) em derme e epiderme. IHC, 40x.



Fonte: Felipe Dutra Rêgo (2024).

Figura 5: *C. porcellus*, detecção de DNA em pele e vísceras, tendo como alvo o gene *hsp70*. Bandas de pele e de baço oriundas de amostras de um dos animais acometidos compatíveis com a banda controle de *L. enriettii*. La: *L. amazonensis*; Lg: *L. guayanensis*; Li: *L. infantum*; Lb: *L. braziliensis*; L.enr: *L. enriettii*. PCR convencional.



Fonte: Felipe Dutra Rêgo (2024)

Porquinhos-da-índia são os mais importantes hospedeiros da *L. enrietti*. Até o presente momento, no estado de São Paulo foi identificada *Leishmania* em um exemplar de preá (*Cavia aperea*) encontrado atropelado, porém não foi realizada identificação da espécie do parasito envolvida neste caso. O achado aponta, contudo, para a capacidade deste roedor silvestre do mesmo gênero de abrigar o protozoário (Richini-Pereira *et al.*, 2014). Entretanto, Muniz e Medina (1948), pesquisadores responsáveis pela descoberta da *L. enriettii*, não obtiveram sucesso ao tentar produzir infecção e doença em preás de forma experimental. Na Austrália, foi identificada uma espécie de patógeno como parte do complexo *L. enriettii*, sendo isolado em cangurus-vermelhos (*Macropus rufus*), wallaroos-do-norte (*Macropus robustus woodwardii*), wallaroos-negros (*M. bernardus*) e wallabies (*M. agilis*), evidenciando a capacidade de espécies pertencentes a esse complexo produzir infecção em diferentes grupos de mamíferos (Dougall *et al.*, 2009; Dougall *et al.*, 2011). É notável que o maior número de relatos de infecção espontânea por *L. enriettii* em porquinhos-da-índia são oriundos da região Sul do Brasil, quando em comparação com as demais regiões brasileiras (Ecco *et al.*, 2000; Fighera *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2020; Soccol *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2023)

No presente relato, não foi possível determinar o vetor envolvido nos casos. Em relação à transmissão de *L. enriettii*, um dos prováveis vetores é o *L. monticola*, flebotomíneo comumente em contato com seres humanos. Além disso, é com frequência capturado em conjunto com outros invertebrados que são confirmadamente vetores de outras espécies de *Leishmania* que causam formas cutâneas e viscerais de doença no Brasil (Paranaíba *et al.*, 2017). Cepas de *L. enriettii* oriundas do Brasil e da Austrália foram inoculadas experimentalmente em mosquitos ceratopogonídeos, sendo confirmada a capacidade de *C. sonorensis* de desenvolver e sustentar infecção (Seblova *et al.*, 2015). Estes estudos apontam para uma capacidade do parasito de infectar diferentes invertebrados, tornando os mesmos vetores da doença. Machado *et al.* (1994), descreveram que os animais infectados haviam estado em área de proximidade à Mata Atlântica, e posteriormente vieram a desenvolver sinais clínicos da doença. O histórico neste caso é um fator relevante na determinação do risco de exposição, que será mais acentuado em áreas onde houver maiores chances de contato com os vetores. Nos casos aqui relatados, os três porquinhos-da-índia acometidos eram oriundos da mesma propriedade rural, portanto tinham contato com áreas de matas e plantações. Ainda há carência bibliográfica no que tange a adequada definição de vetores deste protozoário, fazendo-se necessária uma investigação científica mais aprofundada sobre estas populações de vetores, e associação das áreas de ocorrência dos vetores com os casos para determinação de locais prováveis de infecção e melhor elaboração da epidemiologia da doença.

São diversos os trabalhos experimentais utilizando *L. enrietti* como modelo, contudo os relatos de leishmaniose natural em porquinho-da-índia são relativamente escassos, e ainda inéditos na região sudoeste do Paraná. O diagnóstico obtido no caso em questão alerta sobre a presença do parasito na região, sua característica infecciosa, bem como sobre a suscetibilidade dos porquinhos-da-índia a desenvolverem lesões graves por conta desta infecção. A presença de *L. enriettii* e suas manifestações nos porquinhos-da-índia instiga uma reflexão sobre espécies de *Leishmania* que podem estar presentes tanto em animais domésticos, como silvestres e exóticos, sendo que o potencial zoonótico envolvido não deve ser ignorado.

4 CONCLUSÃO

Nos três porquinhos-da-índia acometidos, as lesões possuíam características similares, com áreas alopecicas com formações nodulares crostosas, por vezes ulceradas, principalmente em região de plano nasal, lábios, pina e dígitos. Ao exame citológico foi possível identificar formas amastigotas compatíveis com *Leishmania* sp. nos três animais. O padrão inflamatório granulomatoso associado à presença de poucos linfócitos, e a abundância de amastigotas intra e extracelulares foram características compartilhadas entre as lesões de todos porquinhos-da-índia avaliados no presente estudo. A imuno-histoquímica revelou marcação positiva para *Leishmania* sp. em pele. Através da PCR convencional, confirmou-se se tratar de um surto associado à *L. enriettii*.

REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **Plos Neglected Tropical Diseases**, p. 1-40, 2016.

ALVES-SOBRINHO, E. V.; PINHEIRO, L. J.; PARANAÍBA, L. F.; FONTES, I. C.; PARREIRAS, P. M.; GONTIJO, N. F.; TAFURI, W. L.; LAURENTI, M. D.; SOARES, R. P. *Leishmania enriettii* visceralises in the trachea, lungs, and spleen of *Cavia porcellus*. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. 1-10, 2022.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. de B.; MANSO, P. P. de A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde: Volume 2**. Rio de Janeiro: IOC, 2010. Cap. 3. p. 89-188

DOUGALL, A. M.; ALEXANDER, B.; HOLT, D. C.; HARRIS, T.; SULTAN, A. H.; BATES, P. A.; ROSE, K.; WALTON, S. F. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 571-579, 14 dez. 2011.

DOUGALL, A. M.; SHILTON, C.; CHOY, J. Low; ALEXANDER, B.; WALTON, S.. New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. *Epidemiology And Infection*, [S.L.], v. 137, n. 10, p. 1516-1520. 2009. **Cambridge University Press** (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268809002313>.

ECCO, R.; LANGOHR, I. M.; SCHOSSLER, J. E. W.; BARROS, S. S.; BARROS, C. S. L. Leishmaniose cutânea em cobaias (*Cavia porcellus*). **Ciência Rural**, v. 30, n. 3, p. 525-528,. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782000000300027>.

FREIRE, M. L.; REGO, F. D.; LOPES, K. F.; COUTINHO, L. A.; GRENFELL, R. F. Q.; AVELAR, D. M.; COTA, G.; PASCOAL-XAVIER, M. A.; OLIVEIRA, E.. Anti-mitochondrial tryparedoxin peroxidase monoclonal antibody-based immunohistochemistry for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Microbiology**, Belo Horizonte, v. 12, p. 1-14. 2022.

FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; SCHMIDT, C.A. Leishmaniose mucocutânea em cobaias (*Cavia porcellus*). **Medvep Revista Científica Medicina Veterinária de Pequenos Animais**. Anim. Estim., v.1, p.177-182, 2003.

GIORGIO, S.; GALLO-FRANCISCO, P. H.; ROQUE, G. A. S.; SILVA, M. F.. Granulomas in parasitic diseases: the good and the bad. **Parasitology Research**, v. 119, n. 10, p. 3165-3180, 2020. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-020-06841-x>.

GRAÇA, G. C. da; VOLPINI, A. C.; ROMERO, G. A. S.; OLIVEIRA NETO, M. P.; HUEB, M.; PORROZZI, R.; BOITÉ, M. C.; CUPOLILLO, E.. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 5, p. 664-674. 2012.

LABORCLIN Produtos Para Laboratório LTDA. **Coloração Panótico Rápido**. 2019. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbnmnibpcajpcgclefindmkaj/https://cdn.media.interlabdist.com.br/uploads/2021/01/620529-COLORACAO-PANOTICO-RAPIDO-CONJ-3x500mL-2019.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2023.

LUZ, E.; GIOVANNONI, M.; BORBA, A.; Infecção de *Lutzomyia monticola* por *Leishmania enriettii*. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná**. Curitiba. 121-16. 1967.

MACHADO, M. I.; MILDNER, R. V.; PACHECO, R. S.; SILVA, M.; BRAGA, R. R.; LAINSON, R.. Naturally acquired infections with *Leishmania enriettii* Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from São Paulo, Brazil. *Parasitology*, [S.L.], v. 109, n. 2, p. 135-138, ago. 1994. Cambridge University Press (CUP).
<http://dx.doi.org/10.1017/s0031182000076241>.

MEDINA, H. Estudos sobre Leishmaniose: I. Primeiros casos de leishmaniose espontânea observados em cobaias. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, p. 39-74, 1946.

MUNIZ, J.; MEDINA, H. Cutaneous leishmaniasis of the guinea pig, *Leishmania enriettii* n. sp. **Hospital (Rio J)**. 33: p 7-25. 1948.

OMS, Organização Mundial da Saúde (org.). Leishmaniasis. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 16 set. 2024.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde (org.). Leishmaniose. 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em: 16 set. 2024.

PARANAIBA, L. F. *Leishmania enriettii*: caracterização preliminar dos lipofosfoglicanos e glicoinositolfosfolípides e infectividade para *Cavia porcellus*. 2014. 91 f. **Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte**, 2014.

PARANAIBA, L. F.; PINHEIRO, L. J.; TORRECILHAS, A. C.; MACEDO, D. H.; MENEZES-NETO, A.; TAFURI, W. L.; SOARES, R. P. *Leishmania enriettii* (Muniz & Medina, 1948): A highly diverse parasite is here to stay. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 13, 5 p. 25 maio 2017.

RIBEIRO, C.; KOUBIACH, K. N.; FACCINI, L. S.; TEIXEIRA, M. C.; SCHÜÜR, F. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; BARROS, C.S.L.; COELHO, A. C. B. Outbreak of leishmaniasis caused by *Leishmania enriettii* in guinea pigs (*Cavia porcellus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 43, p. 1-5, 2023. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-7241>.

RICHINI-PEREIRA, V.; MARSON, P.; HAYASAKA, E.; VICTORIA, C.; SILVA, R.; LANGONI, H.. Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 27, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1678-9199-20-27>.

ROSA, L. D.; SOARES, A.G.; MARCILI, A.; DIAZ, J.D.s.; WOLKMER, P.; BASSUINO, D.M.; SCHAEFER, P.G.J.; HENRICH, K.; ROSSATO, C.K. Cutaneous leishmaniasis in *Cavia porcellus* (guinea pig): case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 744-748, maio 2020.

SEBLOVA, V.; SADLOVA, J.; VOJTKOVA, B.; VOTYPKA, J.; CARPENTER, S.; BATES, P. A.; VOLF, P. The Biting Midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: ceratopogonidae) is capable of developing late stage infections of leishmania enriettii. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 1-15, 14 set. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004060>.

SOCCOL, V. T.; CASTRO, E. A.; REIFUR, L.; TEIXEIRA, V. N.; LANGE, R. R.; LUZ, E. Guinea pigs naturally infected by *Leishmania enriettii*: Clinical analyses, parasite isolation and identification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 64, p. 1-13, 25 ago. 2021.