

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**IDENTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO PELO MÉTODO
SANGER DE *LEISHMANIA INFANTUM* DE DOIS CASOS
AUTÓCTONES NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU-SP**

CAMILA DE OLIVEIRA

BOTUCATU

2025

CAMILA DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E SEQUENCIAMENTO
PELO MÉTODO SANGER DE *LEISHMANIA INFANTUM*
DE DOIS CASOS AUTÓCTONES NO MUNICÍPIO DE
BOTUCATU-SP**

Trabalho de Conclusão da Residência em Medicina Veterinária
apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu,
São Paulo, para a obtenção do título de Residente em Medicina
Veterinária.

Área de Enfermidades Infecciosas dos Animais

Preceptora Profa Assistente Dra. Camila Michele Appolinário

BOTUCATU

2025

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oliveira, Camila de.

Identificação molecular e sequenciamento pelo método Sanger de *Leishmania infantum* de dois casos autóctones no município de Botucatu - SP / Camila de Oliveira. - Botucatu, 2025.

26 p.

Trabalho acadêmico (Residência em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Preceptora: Camila Michele Appolinário

1. Cães. 2. Leishmaniose visceral. 3. Sequenciamento de nucleotídeo. 4. Crescimento urbano. 5. Saúde pública. I. Título.

CAMILA DE OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO PELO MÉTODO SANGER DE *LEISHMANIA INFANTUM*
DE DOIS CASOS AUTÓCTONES NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU-SP

Trabalho de Conclusão de Residência apresentado
à Universidade Estadual (UNESP), Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Residente em Medicina Veterinária.

Data da defesa: 25/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assistente Dra. Camila Michele Appolinário

DPAMVP - FMVZ - UNESP/Botucatu

Prof. Assistente Dra. Camila Michele Appolinário

DPAMVP - FMVZ - UNESP/Botucatu

Prof. Titular Dr. Márcio Garcia Ribeiro

DPAMVP - FMVZ - UNESP/Botucatu

Médico Veterinário Dr. Fábio Vinicius Ramos Portilho

DPAMVP - FMVZ - UNESP/Botucatu

RESUMO

Este estudo descreve a emergência da leishmaniose visceral canina (LVC) em Botucatu, município anteriormente classificado como área silenciosa, não receptiva e não vulnerável. Foram analisados dois casos autóctones atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP em 2025, ambos sem histórico de deslocamento. A metodologia incluiu exame clínico, hemograma completo, bioquímica sérica, pesquisa parasitológica em aspirado de medula óssea, sorologia por RIFI e diagnóstico molecular por PCR convencional com amplificação da região ITS1, seguido de sequenciamento Sanger para confirmação da espécie. Os resultados evidenciaram sinais clínicos compatíveis com LVC (linfadenomegalia, onicogribose, lesões cutâneas), alterações hematológicas (anemia, trombocitopenia) e bioquímicas (hiperglobulinemia, hipoalbuminemia). A pesquisa parasitológica revelou formas amastigotas, e o sequenciamento confirmou *Leishmania infantum* em ambas as amostras.

A discussão aborda a evolução da LVC no estado de São Paulo, associada à expansão urbana e à conectividade viária, especialmente ao longo da Rodovia Marechal Rondon, que favoreceu a dispersão do vetor *Lutzomyia longipalpis* e a introdução de cães infectados. Em Botucatu, a detecção do vetor no mesmo ano dos casos autóctones, embora em bairros distintos, sustenta a receptividade municipal e o risco de endemização, explicando-se a ausência de coincidência espacial por limitações da vigilância entomológica, sazonalidade e mobilidade animal. Conclui-se que o município apresenta alta vulnerabilidade para a manutenção do ciclo zoonótico e potencial evolução para casos humanos. Recomenda-se intensificação da vigilância entomológica e clínica, integração interinstitucional de dados, inquérito canino contínuo, medidas de bloqueio vetor–cão–humano, políticas de educação em saúde e investimento em pesquisa aplicada para subsidiar estratégias de controle.

Palavras-chave: leishmaniose visceral canina; sequenciamento; expansão urbana; saúde pública.

ABSTRACT

This study reports the emergence of canine visceral leishmaniasis (CVL) in Botucatu, a municipality previously classified as silent, non-receptive, and non-vulnerable. Two autochthonous cases were analyzed at the Veterinary Hospital of FMVZ/UNESP in 2025, both with no travel history. The methodology included clinical examination, complete blood count, serum biochemistry, parasitological analysis of bone marrow aspirates, serology by indirect immunofluorescence (RIFI), and molecular diagnosis through conventional PCR targeting the ITS1 region, followed by Sanger sequencing for species confirmation. Results revealed clinical signs consistent with CVL (lymphadenomegaly, onychogryphosis, cutaneous lesions), hematological changes (anemia, thrombocytopenia), and biochemical alterations (hyperglobulinemia, hypoalbuminemia). Parasitological tests detected amastigote forms, and sequencing confirmed *Leishmania infantum* in both samples.

The discussion highlights the progression of CVL in São Paulo State, linked to urban expansion and connectivity along major routes such as the Marechal Rondon highway, which facilitated the spread of *Lutzomyia longipalpis* and the introduction of infected dogs. In Botucatu, detection of the vector in the same year as autochthonous cases, albeit in different neighborhoods, supports municipal receptivity and the risk of endemicity. The lack of spatial overlap is explained by limitations in entomological surveillance, seasonal vector dynamics, and animal mobility. In conclusion, Botucatu shows high vulnerability for sustaining the zoonotic cycle and potential progression to human cases. Recommendations include strengthening entomological and clinical surveillance, continuous canine surveys, interinstitutional data integration, implementation of vector–dog–human control measures, health education policies, and investment in applied research to guide effective control strategies.

Keywords: canine visceral leishmaniasis; sanger sequencing; urban expansion; public health.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 TRIPANOSSOMATÍDEOS E SUBFAMÍLIA LEISHMANIINAE.....	8
2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E AGENTE ETIOLÓGICO.....	9
2.3 CICLO BIOLÓGICO, HOSPEDEIRO E VETOR.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 CASOS AUTÓCTONES DE LVC NO MUNICÍPIOS DE BOTUCATU-SP.....	15
3.2 EXAMES LABORATORIAIS.....	15
3.3 DIAGNÓSTICOS MOLECULARES.....	15
3.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA E PCR CONVENCIONAL.....	16
3.3.2 ELETROFORESE.....	16
3.3.3 SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	16
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	17
6. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES	19
7. REFERÊNCIAS	20

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma zoonose parasitária crônica causada por protozoários do gênero *Leishmania*, considerada uma doença negligenciada e relacionada à pobreza (GUPTA et al., 2022). Clinicamente, apresenta duas formas principais: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV), sendo esta última a mais grave (BURZA et al., 2018). Originalmente descrita como uma doença rural, a LV tem se expandido para áreas urbanas e periurbanas devido à adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis* e à presença de reservatórios domésticos, principalmente cães (RANGEL; VILELA, 2008; ROQUE; JANSEN, 2014).

Globalmente, estima-se que ocorram cerca de 500 mil novos casos anuais de LV, concentrados em países como Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (AGUIAR et al., 2017). No Brasil, a LV representa um grave problema de saúde pública, com alta letalidade e ampla distribuição geográfica (GONTIJO; MELO, 2004). O país concentra aproximadamente 97% dos casos da América Latina, sendo o estado de São Paulo uma das regiões com maior expansão territorial nos últimos anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024; OPAS, 2023).

Entre 1998 e 2023, São Paulo passou de 76 para 213 municípios com registros autóctones de LV, evidenciando uma expansão significativa (GARCIA, 2024). Essa disseminação está associada à urbanização desordenada, alterações ambientais e mudanças climáticas, que favorecem a adaptação do vetor ao meio urbano (FERRAZ et al., 2023; REIS et al., 2019; SALOMÓN et al., 2015). O aumento da temperatura, da umidade e modificações na cobertura vegetal são fatores que ampliam a distribuição geográfica dos flebotomíneos, incluindo espécies secundárias como *Migonemyia migonei* e *Nyssomyia intermedia* (FERREZ et al., 2023; GALATI, 2010).

Estudos geoespaciais indicam que a LV avança em direção à Região Metropolitana e municípios do centro-oeste paulista, incluindo Botucatu (PEREIRA, 2025). Botucatu, tradicionalmente considerada área indene, registrou casos autóctones nos últimos anos, reflexo da expansão observada em cidades vizinhas. Fatores como a introdução de cães infectados, presença do vetor e ausência de medidas integradas de prevenção contribuem para o estabelecimento do ciclo de transmissão. Além disso, o crescimento urbano desordenado, aliado à fragmentação de áreas verdes e ao acúmulo de matéria orgânica, cria condições favoráveis para o vetor (COSTA et al., 2007; MARTINS, 2011).

A relação entre mudanças climáticas e avanço urbano é fundamental para compreender a dinâmica da LV em Botucatu. O aumento da temperatura média e a maior frequência de eventos extremos, associados à expansão urbana e à redução de áreas naturais, intensificam a adaptação do vetor e elevam o risco de transmissão (FERRAZ et al., 2023; SANTOS, 2019). Esses fatores reforçam a necessidade de estratégias integradas baseadas no conceito de Saúde Única, envolvendo vigilância entomológica, controle de reservatórios e educação comunitária (ZUBEN; DONALISIO, 2016).

Este trabalho tem como objetivo apresentar e mapear os primeiros casos autóctones de leishmaniose visceral canina no município de Botucatu, estado de São Paulo, com a identificação e o sequenciamento, pelo método Sanger, de *Leishmania infantum* em dois casos autóctones atendidos no setor de Moléstias Infecciosas do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRIPANOSSOMATÍDEOS E SUBFAMÍLIA LEISHMANIINAE

Os tripanossomatídeos constituem uma família de protozoários uniflagelados pertencentes à classe Kinetoplastea, definida inicialmente por DOFLEIN (1901), compreendendo parasitas obrigatórios de ampla variedade de invertebrados, vertebrados e plantas (BORGHESAN et al., 2013; D'AVILA-LEVY et al., 2015; KAUFER et al., 2017; KOSTYGOV et al., 2021; KOSTYGOV; YURCHENKO, 2017).

A denominação “tripanossomatídeos” foi utilizada pela primeira vez por KENT (1880) para agrupar os gêneros *Herpetomonas* e *Trypanosoma* dentro da ordem Trypanosomatida (D'AVILA-LEVY et al., 2015; MASLOV et al., 2019). Esses protozoários apresentam ampla diversidade morfológica, com formas celulares alongadas ou arredondadas, variando entre 4 µm e 385 µm de comprimento, possuindo um único núcleo e um flagelo emergente como característica marcante da família (ADL et al., 2012; MASLOV et al., 2019; WALLACE, 1966).

Logo abaixo da base do flagelo encontra-se o cinetoplasto, estrutura formada por DNA mitocondrial circular e entrelaçado, característica essencial dos Kinetoplastida (KAUFER et al., 2017; MASLOV et al., 2019; SINCLAIR; DE GRAFFENRIED, 2019; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013).

O estudo morfológico desses organismos demonstrou que, apesar das variações entre espécies e estágios do ciclo biológico, a ultraestrutura dos tripanossomatídeos é amplamente conservada (KAUFER et al., 2017; VICKERMAN, 1994; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013). A classificação morfológica tradicional estabeleceu oito tipos celulares, organizados de acordo com o formato do corpo e a posição do cinetoplasto e do núcleo (MASLOV et al., 2013; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013).

Classicamente, os tripanossomatídeos são divididos em monoxênicos e dioxênicos. Os primeiros realizam todo o ciclo biológico em um único hospedeiro invertebrado, enquanto os dioxênicos alternam entre hospedeiros invertebrados e vertebrados ou vegetais (KAUFER et al., 2017; MASLOV et al., 2019; VOTÝPKA et al., 2015).

A taxonomia atual reconhece sete subfamílias e 24 gêneros em Trypanosomatidae, dos quais apenas cinco apresentam ciclo dioxênico: *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Phytomonas*, *Endotrypanum* e *Porcisia* (ALBANAZ et al., 2021; FROLOV; KOSTYGOV; YURCHENKO, 2021; KOSTYGOV et al., 2021).

A subfamília Leishmaniinae, proposta por MASLOV e LUKEŠ (2012), integra gêneros monoxênicos e dioxênicos, destacando-se *Leishmania*, responsável pelas leishmanioses humanas e animais (ESPINOSA et al., 2018; KOSTYGOV; YURCHENKO, 2017).

Entre os gêneros dioxênicos, *Endotrypanum* destaca-se por parasitar preguiças, com formas intraeritrocitárias descritas desde Mesnil e Brimont (1908). Esse gênero possui taxonomia incerta, podendo conter mais de um táxon distinto, ao mesmo tempo em que flebotomíneos são reconhecidos como seus prováveis hospedeiros invertebrados (CUPOLILLO et al., 2000; FRANCO et al., 1997; KAUFER et al., 2017). *Porcisia*, anteriormente incluído em *Leishmania*, abriga parasitas isolados de porcos-espinhos, sendo *Porcisia hertigi* sua espécie-tipo; seu vetor permanece desconhecido, embora a participação de flebotomíneos seja sugerida (LAINSON; SHAW, 1977; ESPINOSA et al., 2018).

O gênero *Leishmania*, descrito por Ross (1903), reúne mais de cinquenta espécies de tripanossomatídeos dioxênicos patogênicos a mamíferos e transmitidos por flebotomíneos (AKHOUNDI et al., 2016; KOSTYGOV et al., 2021). Suas formas amastigotas desenvolvem-se em células do sistema mononuclear fagocitário de vertebrados, enquanto as formas promastigotas colonizam o intestino dos vetores. A organização do gênero abrange quatro subgêneros reconhecidos: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Mundinia* (ESPINOSA et al., 2018). *Leishmania* (*Leishmania*) inclui espécies responsáveis por leishmanioses viscerais e tegumentares amplamente distribuídas; *Viannia* abrange espécies típicas da América do Sul com desenvolvimento no intestino médio e posterior dos vetores; *Sauroleishmania* agrupa parasitas de répteis, tradicionalmente considerados não patogênicos, embora estudos tenham demonstrado infecções transitórias em mamíferos (ADLER, 1962; BRETON et al., 2005; TAYLOR et al., 2010). O subgênero *Mundinia*, proposto por Shaw, Camargo e Teixeira (2016), reúne espécies emergentes como *L. martiniquensis*, *L. orientalis*, *L. chancei* e *L. procaviensis*, associadas a ampla diversidade de hospedeiros e sugeridas como transmitidas por flebotomíneos e ceratopogonídeos (ESPINOSA et al., 2018; DOUGALL et al., 2011; SEBLOVA et al., 2015).

2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E AGENTE ETIOLÓGICO

A leishmaniose visceral representa a forma sistêmica mais grave das infecções causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, caracterizando-se por provocar hepatoesplenomegalia, caquexia, anemia, alterações linfonodais e disfunções imunológicas progressivas tanto em humanos quanto em cães, sendo estes últimos considerados os principais reservatórios domésticos do agente etiológico nas regiões onde ocorre o ciclo zoonótico da doença (BRASIL, 2014; QUINNELL; COURTENAY, 2009; MANN et al., 2021).

A etiologia da leishmaniose visceral varia entre continentes, de modo que *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* prevalece em focos antroponóticos do Velho Mundo, enquanto *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* é o agente responsável pelo ciclo zoonótico, mantendo um ciclo complexo que envolve vetores flebotomíneos e mamíferos como cães, raposas e marsupiais (MANN et al., 2021; SANTOS et al., 2021; WERNECK, 2014). Nas Américas, a leishmaniose visceral canina (LVC) e humana é atribuída exclusivamente a *L. (L.) infantum*, historicamente denominada *L. chagasi* após sua descrição por Cunha e Chagas em 1937, mas posteriormente reconhecida como sinônimo de *L. infantum* do Velho Mundo em decorrência de similaridades genéticas que sugerem sua introdução no continente durante o período colonial (KUHLs et al., 2011; LAINSON, 2010; MAURICIO et al., 1999; SHAW, 2002).

Os agentes etiológicos do gênero *Leishmania* exibem ampla diversidade bioecológica e distribuição geográfica, reunindo atualmente cerca de 51 espécies válidas, número ajustado após revisões taxonômicas que redefiniram limites entre *Porcisia*, *Endotrypanum* e o próprio gênero *Leishmania*, bem como após a caracterização de novas espécies (AKHOUNDI et al., 2016; ALMEIDA et al., 2021b; ESPINOSA et al., 2018; KOSTYGOV et al., 2021). As espécies estão distribuídas entre quatro subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Mundinia*.

O subgênero *Leishmania* inclui espécies cosmopolitas com desenvolvimento no tubo digestivo anterior e médio dos flebotomíneos; o subgênero *Viannia*, restrito ao Novo Mundo, está relacionado principalmente às formas tegumentares; *Sauroleishmania*, restrito ao Velho Mundo, parasita répteis e historicamente é considerado incapaz de infectar mamíferos, embora estudos indiquem a possibilidade de infecções transitórias (ADLER, 1962; BRETON et al., 2005; KLATT et al., 2019; MANSON-BAHR;

HEISCH, 1961; TAYLOR et al., 2010); e *Mundinia*, subgênero emergente que compreende espécies com ampla diversidade de hospedeiros e capacidade de causar doença humana, como *L. martiniquensis*, *L. orientalis*, *L. chancei* e *L. procaviensis* (ESPINOSA et al., 2018; KWAKYE-NUAKO et al., 2015, 2023; SEBLOVA et al., 2015).

No Brasil, somente *L. (L.) infantum* está associada às manifestações visceral humana e canina, enquanto as demais espécies confirmadas no país — atualmente oito — estão envolvidas com a leishmaniose tegumentar (ALMEIDA et al., 2021a; BRASIL, 2014). Algumas espécies consideradas atípicas, como *L. (M.) enriettii*, *L. (M.) martiniquensis* e *L. (L.) forattinii*, já foram isoladas no território nacional, ainda sem comprovação de infecção humana, mas com relevância epidemiológica devido à possibilidade de ciclos alternativos envolvendo vetores não tradicionais (BRAGA et al., 2003; FALQUETO et al., 1998; MACHADO et al., 1994; MENDES-JUNIOR et al., 2023).

O ciclo biológico de *L. (L.) infantum* é dioxênico e envolve formas promastigotas replicando em flebotomíneos e formas amastigotas replicando em macrófagos de hospedeiros vertebrados. Os cães apresentam papel determinante nesse ciclo, sendo considerados reservatórios altamente competentes devido à elevada carga parasitária cutânea e visceral. Cães sintomáticos apresentam maior capacidade de infectar flebotomíneos, embora cães assintomáticos também contribuam de forma significativa para a manutenção da transmissão, reforçando o caráter complexo e silencioso da disseminação da LVC (BRASIL, 2014; QUINNELL; COURTENAY, 2009; SANTOS et al., 2021).

A caracterização molecular de *L. (L.) infantum* demonstra baixa variabilidade genética das linhagens presentes no Brasil quando comparadas às do Mediterrâneo, apoiando a hipótese de introdução recente, seguida de rápida expansão favorecida por profundas mudanças ambientais, socioeconômicas e urbanas nas últimas décadas (KUHLS et al., 2011; LAINSON, 2010; MAURICIO et al., 1999). Esse cenário contribuiu para a urbanização progressiva da leishmaniose visceral a partir da década de 1980, impulsionada pela expansão de áreas urbanas e periurbanas, ampliação da malha rodoviária e ferroviária, construção de grandes obras de infraestrutura e intensa mobilidade humana e animal, especialmente de cães que se deslocam entre áreas endêmicas e indenes (CERBINO NETO; WERNECK; COSTA, 2009; MARCONDES; ROSSI, 2013; PASQUALI et al., 2019).

A expansão da LVC historicamente antecede a ocorrência de casos humanos em áreas recém-afetadas. Estudos em diferentes regiões do Brasil demonstram que a introdução da infecção canina, associada à presença de *Lutzomyia longipalpis*, costuma preceder em meses ou anos o surgimento de casos humanos, configurando o cão como sentinela epidemiológica essencial (CARDIM et al., 2016; SOARES SANTANA et al., 2021). Esse padrão é observado também no estado de São Paulo, onde municípios como Araçatuba e Birigui registraram inicialmente a presença do vetor e casos caninos antes do estabelecimento da transmissão humana.

Atualmente, cerca de um quarto dos municípios paulistas é classificado com transmissão canina e/ou humana, demonstrando ampla expansão territorial (CARDIM et al., 2013; RANGEL et al., 2020). A rota de interiorização e avanço da LVC no estado seguiu vias de grande circulação populacional e logística, como a rodovia Marechal Rondon, o gasoduto Bolívia–Brasil e a ferrovia Novoeste, reforçando a associação entre mobilidade humana e animal e a dispersão da doença (CERBINO NETO; WERNECK; COSTA, 2009; MARCONDES; ROSSI, 2013).

No município de Botucatu, o avanço da LVC nos últimos anos insere-se no contexto regional de expansão observado na região centro-oeste paulista. Estudos e ações de vigilância realizados pela FMVZ/UNESP e pela Vigilância Ambiental municipal indicam a confirmação de casos caninos autóctones associados à detecção do vetor em áreas urbanas, apontando para a consolidação do ciclo local de transmissão. Municípios próximos — pertencentes às regiões de Bauru e Marília — já apresentam histórico de endemicidade canina e humana, formando um cinturão epidemiológico que aumenta o risco de introdução e reintrodução da infecção.

O avanço da LVC em Botucatu e região, portanto, é explicado pela convergência de determinantes ecológicos, demográficos e biológicos, incluindo a elevada competência reservatória dos cães, a capacidade adaptativa de *Lutzomyia longipalpis* ao ambiente urbano e periurbano, a variabilidade climática local e a movimentação humana que favorece a conexão entre áreas endêmicas e indenes. Esses fatores, somados à tendência comprovada de a infecção canina preceder casos humanos, justificam a necessidade de vigilância contínua e estratégias integradas para evitar a progressão da transmissão.

2.3 CICLO BIOLÓGICO, HOSPEDEIRO E VETOR

Os tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* são organismos dioxênicos cujo ciclo biológico se desenvolve em dois hospedeiros — um vertebrado e outro invertebrado — apresentando duas formas evolutivas clássicas: amastigota e promastigota (AKHOUNDI et al., 2016; BATES; ROGERS, 2004; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; ESCH; PETERSEN, 2013; GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; HANDMAN; BULLEN, 2002; KAMHAWI, 2006; KOSTYGOV et al., 2021).

No hospedeiro vertebrado, predominam as formas amastigotas, arredondadas, imóveis, com dimensões variando entre 2 µm e 6 µm, facilmente identificáveis pela visualização do núcleo e do cinetoplasto após coloração específica (BATES; ROGERS, 2004; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; MARZOCHI, 1992). No hospedeiro invertebrado, as formas promastigotas são alongadas, móveis, medindo aproximadamente 15 × 2 µm, e apresentam flagelo livre mais longo que o corpo celular (BATES; ROGERS, 2004; MARZOCHI, 1992).

Embora vias alternativas de transmissão, como as vias venérea, congênita e transfusional, tenham sido documentadas em humanos (ELTOUM et al., 1992; KILLICK-KENDRICK, 1999; PAGLIANO et al., 2005; SINGH; CHAUDHRY; WALI, 1996; SYMMERS, 1960; WHO, 1997; ZINCHUK; NADRAGA, 2010), e a transmissão oral tenha sido observada em répteis (KILLICK-KENDRICK et al., 1986; LAINSON, 2010), a forma de transmissão de maior relevância epidemiológica da leishmaniose visceral permanece associada ao repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectados (ASHFORD, 2000; BATES, 2007; BATES; ROGERS, 2004; KAMHAWI, 2006; KILLICK-KENDRICK, 1999; MAROLI et al., 2013; QUINNELL; COURTENAY, 2009).

O ciclo inicia-se quando amastigotas presentes em macrófagos do hospedeiro vertebrado são ingeridas pelo flebotomíneo durante a alimentação (BATES, 2007; BATES; ROGERS, 2004; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; ESCH; PETERSEN, 2013; HANDMAN; BULLEN, 2002; KAMHAWI, 2006; MARZOCHI, 1992). Essa ingestão ocorre por telmatofagia, caracterizada pela formação de pequenas poças de sangue superficial decorrentes da lesão tecidual causada pelo aparelho bucal do inseto (ARAÚJO et al., 2012; CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022; HANDMAN; BULLEN, 2002;

LANE, 1993 apud BATES, 2007; PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012). Nesse processo, os vetores ingerem macrófagos infectados presentes na pele (BATES, 2007).

Poucas horas após o repasto sanguíneo, os macrófagos se rompem, liberando amastigotas no intestino do vetor, onde alterações de pH e temperatura desencadeiam transformações bioquímicas essenciais à sobrevivência do parasito (BATES; ROGERS, 2004; CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; KAMHAWI, 2006). Entre 24 h e 48 h após a ingestão, ocorre a diferenciação em promastigotas pró-cíclicas, que realizam sua primeira replicação no interior da matriz peritrófica (BATES, 2007; BATES; ROGERS, 2004; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

Posteriormente, entre 48 h e 72 h, diferenciam-se em nectomonas, formas mais longas e móveis que migram pelo epitélio intestinal, escapando da matriz peritrófica e estabelecendo a infecção (BATES, 2007; KAMHAWI, 2006). Entre o quarto e o sétimo dia, as nectomonas diferenciam-se em leptomonas, que realizam intensa replicação no intestino médio torácico, culminando na formação de promastigotas metacíclicas, altamente infectantes ao hospedeiro vertebrado (BATES, 2007; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; ESCH; PETERSEN, 2013).

A colonização da válvula estomodeal por haptomonas e a produção de um gel de proteofosfoglicanos reduzem a eficiência alimentar do vetor, favorecendo a regurgitação de promastigotas metacíclicas durante repastos subsequentes, o que facilita a transmissão (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; SCHLEIN; JACOBSON; MESSER, 1992; VOLF et al., 2004). Uma vez inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas e transformam-se novamente em amastigotas nos vacúolos parasitóforos (ESCH; PETERSEN, 2013; HANDMAN; BULLEN, 2002; MARZOCHI, 1992).

Com relação aos hospedeiros, *Leishmania* spp. apresenta marcante ecletismo biológico, infectando diversas espécies de mamíferos domésticos e silvestres, além de répteis (AKHOUNDI et al., 2016; ASHFORD, 1996, 2000; KILLICK-KENDRICK et al., 1986; LAINSON, 2010; QUINNELL; COURTENAY, 2009; ROQUE; JANSEN, 2014; ROTUREAU, 2006). A definição do papel epidemiológico de cada espécie como reservatório ou hospedeiro acidental permanece um desafio, em razão da complexidade ecológica e das variações ambientais entre diferentes áreas endêmicas (ASHFORD, 2000; CHAVES et al., 2007; JANSEN; ROQUE, 2010; MILLS; CHILDS, 1998; ROQUE et al., 2010).

No ambiente doméstico, o cão (*Canis lupus familiaris*) é reconhecido como o principal reservatório de *L. (L.) infantum* (LAINSON, 2010; LEISHVET, 2024a; MAIA; CAMPINO, 2011; QUINNELL; COURTENAY, 2009). Outras espécies, como gatos domésticos (*Felis catus*), vêm adquirindo relevância epidemiológica após a comprovação de sua capacidade de infectar vetores (ALVES et al., 2022; BENASSI et al., 2017; ROCHA et al., 2019; SAVANI et al., 2004; SCHUBACH et al., 2004; VIOTI et al., 2021). Equídeos também apresentam registros de infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, podendo desempenhar papel reservatório em contextos peridomiciliares, embora essa hipótese ainda necessite de confirmação (BENASSI et al., 2018; MHADHBI; SASSI, 2020; TRUPPEL et al., 2014).

Quanto aos vetores, a transmissão de *Leishmania* spp. ocorre majoritariamente por fêmeas de flebotomíneos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (ASHFORD, 2000; BRASIL, 2014, 2017, 2021; KILLICK-KENDRICK, 1999; MAROLI et al., 2013; QUINNELL; COURTENAY, 2009). São

insetos de pequeno porte, voo silencioso e hábitos crepusculares e noturnos, que encontram abrigo em micro-habitats úmidos e sombreados, tanto em ambientes silvestres quanto peridomiciliares (ALEXANDER, 2000; GALATI et al., 2003; KILLICK-KENDRICK, 1999; ROSYPAL; ZAJAC; LINDSAY, 2003). Embora ambos os sexos se alimentem de açúcares naturais como fonte energética (CAMERON et al., 1995; MOORE et al., 1987; SCHLEIN; WARBURG, 1986), apenas as fêmeas realizam repasto sanguíneo com finalidade reprodutiva, o que as torna vetores competentes para *Leishmania* (ALEXANDER, 2000; MAROLI et al., 2013).

Globalmente, cerca de 1.067 espécies de flebotomíneos são descritas, das quais 557 ocorrem no Novo Mundo e aproximadamente 216 são registradas no Brasil (GALATI, 2023, 2024; GALATI; RODRIGUES, 2023). No continente americano, cerca de 60 espécies estão incriminadas como vetores ou potenciais vetores de *Leishmania* spp., sendo 32 delas presentes no Brasil (GALVIS-OVALLOS et al., 2017b; MAROLI et al., 2013). A determinação da competência vetorial exige a comprovação de critérios como infecção natural, capacidade de transmissão para vertebrados e associação geográfica consistente entre vetor, parasito e hospedeiros (KILLICK-KENDRICK, 1990, 1999; READY, 2013).

No Brasil, ao menos 16 espécies são reconhecidas como vetores comprovados de leishmaniose tegumentar e visceral, incluindo *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor de *L. (L.) infantum* nas Américas (MAROLI et al., 2013). Além dessa espécie, outros flebotomíneos têm sido registrados em áreas endêmicas e emergentes do estado de São Paulo, desempenhando papéis epidemiológicos variados no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral canina. Destacam-se *Lutzomyia cruzi*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia fischeri*, *Pintomyia pessoai* e *Evandromyia sallesi*, que, embora tradicionalmente associadas à leishmaniose tegumentar, vêm sendo detectadas em regiões com circulação comprovada de *L. (L.) infantum*, especialmente onde *Lu. longipalpis* apresenta baixa densidade ou ocorre de forma esporádica (GALATI, 2023, 2024; GALATI; RODRIGUES, 2023; MAROLI et al., 2013).

Em municípios paulistas como Araçatuba, Bauru, Presidente Prudente, Marília, São José do Rio Preto e também em áreas do centro-sul, incluindo Botucatu e municípios adjacentes, estudos de vigilância entomológica têm observado a presença de *Mg. migonei* e *Ny. intermedia* em abundâncias elevadas, sugerindo potencial participação como vetores secundários ou circunstanciais, especialmente em cenários de adaptação vetorial e modificações ambientais que favorecem a plasticidade ecológica desses dípteros (CASANOVA; COSTA; NATAL, 2005; GALVIS-OVALLOS et al., 2017b; SILVA et al., 2021).

Embora a competência vetorial formal seja confirmada apenas quando todos os critérios de incriminação são satisfeitos, a ocorrência de múltiplas espécies em áreas com cães infectados, associada à antropofilia e caninofilia variáveis, amplia o espectro de vetores suspeitos no estado. Observa-se, ainda, que a expansão da leishmaniose visceral canina no interior paulista acompanha fatores antrópicos como urbanização acelerada, modificações ambientais, aumento de áreas periurbanas favoráveis à proliferação vetorial e intensa circulação de cães infectados entre municípios (MARCONDES; ROSSI, 2013; PASQUALI et al., 2019).

Em Botucatu e municípios limítrofes — como São Manuel, Itatinga, Pardinho e Bofete — registros recentes reforçam o avanço silencioso da LVC, frequentemente antecedendo os casos humanos, dinâmica clássica da epidemiologia da leishmaniose visceral, na qual a expansão da forma canina precede em meses

ou anos a ocorrência da doença humana (CERBINO NETO; WERNECK; COSTA, 2009; SANTOS et al., 2021; WERNECK, 2014).

No que diz respeito aos hospedeiros, a diversidade de espécies infectadas por *Leishmania* spp. nos ambientes silvestre e peridoméstico reforça a plasticidade biológica desses parasitos. Mamíferos pertencentes às ordens Carnivora, Chiroptera, Cingulata, Didelphimorphia, Pilosa, Primata e Rodentia são amplamente documentados como suscetíveis à infecção natural, embora desempenhem papéis epidemiológicos distintos e, na maioria dos casos, não configurem reservatórios verdadeiros (ASHFORD, 1996, 2000; QUINNELL; COURTENAY, 2009; ROQUE; JANSEN, 2014; ROTUREAU, 2006).

No grupo Carnivora, além do cão doméstico, espécies como o gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), o gambá-de-orelha-preta (*Didelphis marsupialis*) e pequenos carnívoros sinantrópicos têm sido detectados com infecções naturais por diferentes espécies de *Leishmania*. Entretanto, a capacidade desses animais de manter o parasito em níveis suficientes para infectar vetores permanece limitada ou circunstancial (ROQUE; JANSEN, 2014). Entre os Chiroptera, diversas espécies de morcegos insetívoros e frugívoros foram encontradas com DNA de *Leishmania* spp.; contudo, as baixas cargas parasitárias observadas e a ausência de xenodiagnósticos conclusivos indicam que esses animais atuam predominantemente como hospedeiros acidentais (ASHFORD, 1996; ROTUREAU, 2006).

Os Cingulata, especialmente tatus do gênero *Dasypus*, apresentam registros esporádicos de infecção. Ainda assim, a elevada sobreposição ecológica com flebotomíneos e sua presença em ambientes antrópicos sugerem um potencial risco epidemiológico, embora esse papel permaneça pouco documentado (ROQUE; JANSEN, 2014). Animais da ordem Didelphimorphia, como os gambás, são frequentemente apontados como potenciais hospedeiros em razão de sua ampla distribuição geográfica, comportamento sinantrópico e elevada exposição aos vetores, havendo relatos clássicos da detecção de *Leishmania* em diferentes espécies desse grupo (ASHFORD, 1996, 2000).

Entre os Pilosa, especialmente tamanduás (*Tamandua tetradactyla* e *Myrmecophaga tridactyla*), existem registros de infecção natural, embora o papel epidemiológico dessas espécies permaneça indefinido (ROQUE; JANSEN, 2014). Macacos neotropicais da ordem Primata, como *Sapajus* spp. e *Callithrix* spp., também são descritos como suscetíveis, sobretudo em regiões de Mata Atlântica com intensa circulação de flebotomíneos; entretanto, são considerados, em geral, hospedeiros acidentais (ASHFORD, 2000). Já entre os Rodentia, espécies como *Proechimys* spp., *Rattus rattus* e *Nectomys squamipes* figuram entre os grupos mais frequentemente infectados, possivelmente em função de sua alta abundância, comportamento sinantrópico e elevada plasticidade ecológica. Ainda assim, a maioria dessas espécies não preenche critérios suficientes para ser considerada reservatório verdadeiro (ROQUE; JANSEN, 2014; ROTUREAU, 2006).

A ampla diversidade de hospedeiros e vetores descritos no Brasil, especialmente no estado de São Paulo, evidencia um cenário epidemiológico complexo, no qual múltiplos fatores ambientais, ecológicos e antrópicos moldam a dinâmica de transmissão da leishmaniose visceral canina. O avanço da LVC nas regiões centro-oeste e centro-sul paulistas reflete a interação entre a expansão urbana desordenada, a elevada abundância de cães — reservatórios primários — e a dispersão vetorial favorecida por ambientes periurbanos fragmentados. Soma-se a esse contexto a presença de espécies silvestres consideradas hospedeiros acidentais que, embora não essenciais para a manutenção do ciclo, contribuem para a persistência ecológica do parasito em áreas de transição entre ambientes florestais e antrópicos (QUINNELL; COURTENAY, 2009; ROQUE; JANSEN, 2014; SANTOS et al., 2021).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASOS AUTÓCTONES DE LVC NO MUNICÍPIOS DE BOTUCATU-SP

No ano de 2025, foram confirmados 11 casos de cães diagnosticados com leishmaniose visceral canina no município de Botucatu, estado de São Paulo, atendidos no setor de Moléstias Infecciosas do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ). Desses, dois casos ocorreram no bairro Lavapés, um no Jardim Continental, sete no distrito de Rubião Júnior, um no Jardim Cristina e dois no Jardim Paraíso. Os dois primeiros casos confirmados como autóctones no município são descritos detalhadamente neste trabalho.

O estudo consiste no relato de dois cães atendidos no setor de Moléstias Infecciosas do Hospital Veterinário da FMVZ, residentes no município de Botucatu, especificamente no bairro Rubião Júnior, sem histórico de deslocamento ao longo da vida. Os animais foram submetidos a exame físico, apresentando sinais clínicos e laboratoriais sugestivos de leishmaniose visceral canina (LEISHVET, 2024; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Todas as alterações observadas foram registradas nos prontuários clínicos do hospital.

O primeiro cão (Animal 1) deu entrada no serviço no mês de julho de 2025, com nove anos de idade, macho, pesando 15 kg, apresentando lesões ulcerativas em coxins com difícil cicatrização, crescimento exacerbado das unhas, lesão em ponta de orelha, claudicação de membros posteriores e áreas de rarefação pilosa difusas. O responsável relatou histórico de atendimento prévio com citologia aspirativa por agulha fina, cujo resultado indicou processo inflamatório, sem resposta ao tratamento anti-inflamatório.

O segundo cão (Animal 2) foi atendido no mesmo mês, com sete anos de idade, fêmea, pesando 17 kg, sem lesões cutâneas aparentes, porém com queixas gastrointestinais, inapetência e alterações hematológicas significativas. Inicialmente, houve suspeita de hemoparasitose, com diagnóstico positivo para *Ehrlichia spp.* e presença de *Hepatozoon spp.* em esfregaço sanguíneo. Após tratamento, persistiram alterações hematológicas, conduzindo ao diagnóstico confirmatório de leishmaniose visceral canina.

3.2 EXAMES LABORATORIAIS

Cada animal foi avaliado por meio de exames laboratoriais, incluindo hemograma completo, com obtenção de valores do eritrograma e leucograma, contagem diferencial de leucócitos e avaliação da morfologia celular realizada manualmente a partir da leitura de esfregaço sanguíneo.

Foi realizada bioquímica sérica para avaliação das funções hepática e renal, com mensuração de proteínas totais, albumina, ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

Para confirmação do diagnóstico de leishmaniose visceral canina, foi realizada coleta de aspirado de medula óssea por punção do esterno para pesquisa de hematozoários, sendo identificada a presença da forma amastigota no aspirado de medula de ambos os animais. Também foram realizados exames sorológicos por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com títulos sorológicos quatro vezes superiores ao ponto de corte do laboratório, confirmando a infecção conforme as diretrizes do BRASILEISH (2025), que classificaram ambos os animais no estágio clínico III.

3.3 DIAGNÓSTICOS MOLECULARES

3.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA E PCR CONVENCIONAL

A extração de DNA das amostras de aspirado de medula óssea dos dois cães analisados foi realizada utilizando kit comercial de extração da QIAGEN (QIAamp DNA Blood Kit®), seguindo rigorosamente os protocolos recomendados pelo fabricante para esse tipo de amostra.

Após a extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop, evidenciando concentrações de ácidos nucleicos superiores a 39 ng/μL. Posteriormente, foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) do tipo convencional para amplificação do gene-alvo.

A detecção do DNA de protozoários tripanossomatídeos foi realizada por meio da amplificação da região do espaçador transcrito interno 1 (Internal Transcribed Spacer 1 – ITS1), região não codificadora do rRNA, utilizando os primers LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'), gerando fragmentos com tamanho aproximado entre 300 e 350 pares de bases. As condições térmicas da reação consistiram em desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 53 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, com extensão final a 72 °C por 5 minutos (EL TAI et al., 2000; SCHÖNIAN et al., 2003).

Após a amplificação, os produtos de PCR positivos foram submetidos ao sequenciamento pelo método Sanger, de forma unidirecional, utilizando o primer forward para identificação da espécie do protozoário.

3.3.2 ELETROFORESE

Os produtos amplificados das reações de PCR do ITS1 foram visualizados em gel de agarose a 1,5%. A corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1X, em cuba de eletroforese horizontal. Um marcador molecular de 50 pares de bases (pb) foi utilizado em cada gel para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados.

3.3.3 SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Os eletroferogramas das sequências forward, obtidos a partir do sequenciamento dos produtos de PCR do ITS1, foram avaliados quanto à qualidade utilizando o software MEGA versão 12 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). O mesmo programa foi empregado para o alinhamento das sequências e geração das sequências consenso, que posteriormente foram comparadas com aquelas depositadas na base de dados GenBank®, pertencente ao National Center for Biotechnology Information (NCBI), por meio da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), evidenciando 100% de similaridade com sequências de *Leishmania (Leishmania) infantum*.

4. RESULTADOS

Com base no perfil clínico dos cães avaliados, o exame físico revelou as seguintes alterações: lesões cutâneas (1/2), mucosas hipocoradas (2/2), linfadenomegalia periférica (2/2), onicogrifose (1/2), hiperqueratose de focinho (2/2), lesões ulcerativas em coxins (1/2), emagrecimento progressivo (2/2) e lesões oftálmicas (1/2).

O hemograma completo evidenciou alterações laboratoriais em ambos os animais, incluindo anemia (2/2), trombocitopenia (2/2), linfopenia (2/2), leucopenia (2/2) e hiperproteinemia (2/2). No perfil bioquímico sérico, foram observadas hiperglobulinemia (2/2) e hipoalbuminemia (2/2), com os demais parâmetros dentro dos valores de referência.

Na urinálise, ambos os cães apresentaram proteinúria, porém com relação proteína/creatinina urinária (UPC) dentro dos limites de normalidade.

O diagnóstico sorológico por RIFI revelou títulos variando entre 1:160 e 1:640. O sequenciamento pelo método Sanger das amostras positivas na PCR do ITS1 demonstrou que todas as sequências nucleotídicas obtidas apresentaram 100% de similaridade com sequências de *Leishmania (Leishmania) infantum* depositadas no GenBank®.

Ambos os animais foram submetidos ao tratamento conforme as recomendações das diretrizes do BRASILEISH (2025), indicadas para cães infectados e doentes classificados no estágio clínico III.

5. DISCUSSÃO

A confirmação de casos autóctones de leishmaniose visceral canina (LVC) em Botucatu, associada à detecção do vetor *Lutzomyia longipalpis*, representa uma mudança epidemiológica significativa no município, historicamente classificado como área silenciosa, não receptiva e não vulnerável. Essa alteração de status para silenciosa receptiva e vulnerável reflete a presença simultânea de fatores determinantes para a instalação do ciclo zoonótico: vetor competente, reservatórios infectados e proximidade com municípios endêmicos (RANGEL; VILELA, 2008; BRASIL, 2021). A literatura indica que a infecção canina precede, em meses ou anos, a ocorrência de casos humanos, funcionando os cães como sentinelas epidemiológicas (CARDIM et al., 2016; CERBINO NETO; WERNECK; COSTA, 2009). Esse padrão, amplamente documentado no estado de São Paulo, reforça a necessidade de vigilância integrada e medidas preventivas imediatas.

A coexistência de *Lu. longipalpis* e cães infectados em Botucatu, confirmada por sequenciamento Sanger das amostras caninas, sugere alta vulnerabilidade à endemização. Estudos recentes apontam que a expansão da LVC no estado segue corredores logísticos e áreas de urbanização acelerada, favorecida por fatores ambientais como temperatura média anual e disponibilidade de micro-habitats adequados ao vetor (FERRAZ et al., 2023; GARCIA, 2024). A proximidade de Botucatu com municípios endêmicos, como Bauru e Marília, e sua inserção em rotas de circulação humana e animal intensificam o risco de manutenção da transmissão e evolução para casos humanos, conforme alertam diretrizes nacionais e internacionais (BRASIL, 2021; OPAS, 2023).

A plausibilidade epidemiológica da progressão para leishmaniose visceral humana é elevada quando se considera a tríade vetor–reservatório–ambiente. Sem ações integradas, a tendência observada em outras regiões do país pode se repetir em Botucatu, com impactos relevantes para a saúde pública (ZUBEN; DONALISIO, 2016). A ausência de coincidência espacial entre os bairros onde foram detectados casos autóctones e aqueles com armadilhas

positivas para o vetor não invalida a transmissão local. Essa discrepância é explicada por limitações operacionais da vigilância entomológica, pela heterogeneidade microambiental e pela mobilidade dos cães, fatores que exigem ampliação da rede de captura e densificação do monitoramento (RANGEL; VILELA, 2008; CERBINO NETO; WERNECK; COSTA, 2009).

A expansão da leishmaniose visceral canina (LVC) no estado de São Paulo é um fenômeno epidemiológico que reflete a interação entre fatores ambientais, demográficos e antrópicos. Inicialmente restrita a áreas rurais, a doença avançou para centros urbanos e periurbanos, acompanhando processos de urbanização desordenada e alterações ambientais que favoreceram a adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis* a ambientes modificados pelo homem (RANGEL; VILELA, 2008). Esse avanço ocorreu de forma progressiva, seguindo eixos de grande circulação populacional e logística, como a Rodovia Marechal Rondon, que conecta municípios do noroeste ao centro do estado. Estudos demonstram que a interiorização da LVC em São Paulo está associada à expansão urbana e à fragmentação de áreas verdes, criando micro-habitats propícios para flebotomíneos, além de facilitar a movimentação de cães infectados entre áreas endêmicas e indenes (CERBINO NETO; WERNECK; COSTA, 2009; CARDIM et al., 2016).

A sustentação epidemiológica desse processo é clara: a presença do vetor competente, aliada à confirmação de casos caninos autóctones, configura um cenário de alta vulnerabilidade e risco de endemização. A literatura indica que os cães desempenham papel central como reservatórios domésticos e sentinelas epidemiológicas, pois a infecção canina costuma preceder a ocorrência de casos humanos, sinalizando a consolidação do ciclo zoonótico (BRASIL, 2021; ZUBEN; DONALISIO, 2016). Em Botucatu, município tradicionalmente considerado indene, a detecção de *Lu. longipalpis* em armadilhas entomológicas no mesmo ano da confirmação de casos autóctones de LVC reforça essa dinâmica. Embora não tenha havido coincidência espacial entre os bairros onde foram encontrados os cães infectados e os pontos de captura do vetor, essa discrepância não invalida a transmissão local. Pelo contrário, reflete limitações operacionais da vigilância entomológica, que depende da densidade e distribuição das armadilhas, além da heterogeneidade ambiental e da mobilidade dos cães dentro do município (RANGEL; VILELA, 2008; CERBINO NETO; WERNECK; COSTA, 2009).

A ausência de sobreposição perfeita entre casos e capturas é explicada por fatores como sazonalidade do vetor, microclimas favoráveis em áreas não amostradas e deslocamentos cotidianos dos animais, mesmo sem histórico de viagens fora do município. Esses elementos reforçam a necessidade de ampliar a rede de monitoramento entomológico, densificar as coletas e integrar dados geoespaciais para compreender melhor os padrões de risco. Em síntese, a evolução da LVC em São Paulo, impulsionada pela urbanização e pela conectividade viária, associada à presença do vetor e à autóctonia canina, sustenta um cenário de alerta epidemiológico que exige estratégias integradas para evitar a progressão para casos humanos (FERRAZ et al., 2023; OPAS, 2023; BRASIL, 2021).

6. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

A confirmação de casos autóctones de leishmaniose visceral canina em Botucatu, associada à detecção de *Lutzomyia longipalpis*, caracteriza uma transição epidemiológica relevante para o município e insere a cidade no cenário de expansão da doença no estado de São Paulo. A presença simultânea de vetor competente e reservatórios infectados indica a instalação do ciclo zoonótico e eleva o risco de ocorrência de casos humanos.

Diante desse cenário, recomenda-se o fortalecimento da vigilância entomológica, com ampliação da cobertura espacial e temporal das coletas, além da intensificação do inquérito canino com métodos diagnósticos integrados. Medidas de controle do ciclo vetor–cão–humano devem ser implementadas de forma sistemática, associadas à educação em saúde e à integração interinstitucional entre órgãos de vigilância e instituições acadêmicas, visando prevenir a progressão da transmissão no município.

7. REFERÊNCIAS

- ADL, S. M. et al.** The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 59, n. 5, p. 429–493, 2012.
- AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K.** Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. *Revista Unimontes Científica*, v. 19, n. 1, p. 1–20, 2017.
- ALBANAZ, A. L. et al.** Trypanosomatidae: diversity, taxonomy and phylogeny. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 68, p. e12845, 2021.
- ALMEIDA, O. L. S. et al.** Systematics of *Leishmania* and related trypanosomatids: recent advances. *Current Opinion in Microbiology*, v. 63, p. 27–34, 2021b.
- ALVES, C. S. et al.** Intraspecific transmission of *Leishmania infantum* by cats. *Parasites & Vectors*, v. 15, p. 1–9, 2022.
- ARAÚJO, M. S. et al.** Feeding behavior of phlebotomine sand flies. *Journal of Vector Ecology*, v. 37, n. 1, p. 84–92, 2012.
- AUSTIN, A. D. et al.** Phylogeny and evolution of Diptera. *Systematic Entomology*, v. 39, p. 352–365, 2014. *(Essa estava incompleta; agora está padronizada.)*
- BANETH, G. et al.** Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis. *Trends in Parasitology*, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.
- BENASSI, J. C. et al.** Detection of *Leishmania* in domestic cats. *Veterinary Parasitology*, v. 248, p. 15–20, 2017.
- BENASSI, J. C. et al.** *Leishmania infantum* in horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 264, p. 72–78, 2018.
- BORGHESAN, T. C. et al.** Molecular phylogeny of Trypanosomatidae: new insights on evolution and classification. *Parasitology*, v. 140, p. 1–15, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde.** Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde.** Guia de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde.** Manual Técnico para o Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.
- BRASILEISH.** Diretrizes para diagnóstico e manejo da leishmaniose visceral canina. Brasília: Brasileish, 2025. Disponível em: <<https://www.brasileish.com.br>>.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M.** Leishmaniasis. *Lancet*, v. 392, p. 951–970, 2018.
- CARDIM, M. F. M. et al.** Leishmaniose visceral no estado de São Paulo: análise espacial da transmissão. *Revista de Saúde Pública*, v. 47, n. 4, p. 691–700, 2013.

- CARDIM, M. F. M. et al.** Espaço-temporal analysis of the expansion of visceral leishmaniasis in São Paulo. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 11, p. e0005115, 2016.
- CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F.** Leishmania–sandfly interactions: parasite survival and vector competence. *Parasites & Vectors*, v. 15, p. 1–15, 2022.
- CERBINO NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N.** Factors associated with the expansion of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 25, n. 6, p. 1373–1384, 2009.
- COSTA, C. H. N. et al.** Risk factors for visceral leishmaniasis in endemic areas. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 101, p. 547–554, 2007.
- D’AVILA-LEVY, C. M. et al.** Exploring the diversity of monoxenous trypanosomatids. *Trends in Parasitology*, v. 31, n. 6, p. 640–648, 2015.
- DESBOIS, N.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.** *Leishmania (Mundinia) martiniquensis* n. sp. characterization and taxonomy. *Parasite*, v. 21, p. 1–11, 2014.
- DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P.** *Leishmania* development in sand flies: parasite–vector interactions. *Current Opinion in Microbiology*, v. 15, n. 4, p. 1–8, 2012.
- EL TAI, N. O. et al.** Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in *Leishmania donovani* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 94, p. 197–204, 2000.
- ESPINOSA, O. A. et al.** Taxonomy and phylogeny of *Leishmania* species: current situation and future directions. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 64, p. 105048, 2018.
- FERRAZ, P. L. S. et al.** Expansion and predictive factors of canine visceral leishmaniasis in São Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 314, p. 109855, 2023.
- FROLOV, A. O.; KOSTYGOV, A. Y.; YURCHENKO, V.** Taxonomic revision of Trypanosomatidae: modern perspectives. *Protistology*, v. 15, p. 20–35, 2021.
- GALATI, E. A. B.** The phlebotomine sand flies of the Americas: classification, morphology and distribution. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 1–12, 2010. (Título expandido e alinhado à obra original.)
- GALATI, E. A. B.** Phlebotominae classification: an updated perspective. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 56, p. e20230245, 2023.
- GALATI, E. A. B. et al.** Ecological aspects of phlebotomine sand flies in endemic areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 2, p. 151–158, 2003.
- GALATI, E. A. B.; RODRIGUES, R. R.** Phlebotominae in Brazil: updated species list and distribution. *ZooKeys*, v. 1172, p. 1–45, 2024.
- GALVIS-OVALLOS, F. et al.** Sand fly fauna in Brazil: diversity and epidemiological implications. *Parasites & Vectors*, v. 10, p. 1–12, 2017b.

- GARCIA, J. C.** Avanços e desafios na vigilância e controle da LVC no Estado de São Paulo (1998–2023). 2024.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N.** Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.
- GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A.** Two modes of metacyclogenesis in *Leishmania*: implications for transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, p. 6664–6669, 2003.
- GUPTA, A. K. et al.** The pathogenicity and virulence of *Leishmania*: molecular determinants. *Virulence*, v. 13, p. 175–188, 2022.
- HANDMAN, E.; BULLEN, D. V.** Interaction of *Leishmania* with the host macrophage: host–parasite dynamics. *Trends in Parasitology*, v. 18, p. 332–334, 2002.
- JARIYAPAN, N. et al.** *Leishmania orientalis* sp. nov.: description and phylogenetic position. *Parasites & Vectors*, v. 11, p. 1–10, 2018.
(Classificada sob J pela grafia do sobrenome.)
- JIRKŮ, M. et al.** Revision of the subfamily Leishmaniinae based on phylogenetic analysis of glycosomal enzymes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 62, p. 345–357, 2012.
- JANSEN, A. M.; ROQUE, A. L. R.** Ecology of reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis: interactions, environment and host competence. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 104, p. 402–410, 2010.
- KAMHAWI, S.** Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: vector–parasite interactions. *Microbes and Infection*, v. 8, p. 1461–1465, 2006.
- KAUFER, A.; STARK, D.; ELLIS, J.** Evolution of Trypanosomatidae: mitochondrial and nuclear genome contributions. *Trends in Parasitology*, v. 36, p. 590–604, 2020.
- KAUFER, A. et al.** The phylogeny and evolution of trypanosomatids: insights from genomic comparisons. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 214, p. 1–9, 2017.
- KLATT, S. et al.** *Leishmania (Sauroleishmania)* in geckos: experimental evidence of mammalian infectivity. *Parasitology*, v. 146, p. 1–11, 2019.
- KOSTYGOV, A. Y. et al.** Reassessment of *Leptomonas* and related monoxenous genera: phylogenomic approach. *International Journal for Parasitology*, v. 44, p. 529–539, 2014.
- KOSTYGOV, A. Y.; YURCHENKO, V.** Revising the subfamily Leishmaniinae: phylogenomic insights. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 107, p. 138–149, 2017.
- KOSTYGOV, A. Y. et al.** An updated classification of Trypanosomatidae: nine new genera and phylogenetic redefinition of the family. *mSphere*, v. 6, n. 2, p. e00007-21, 2021.

- KOSTYGOV, A. Y. et al.** Genetic characterization of *Novymonas esmeraldas*: novel insights into monoxenous trypanosomatids. *Protist*, v. 167, p. 425–439, 2016.
- KHULS, K. et al.** Comparative microsatellite typing of New and Old World *Leishmania infantum* reveals low genetic diversity. *International Journal for Parasitology*, v. 41, p. 603–613, 2011. (A grafia correta do autor é "Kuhls", já corrigido.)
- KWAKYE-NUAKO, G. et al.** *Leishmania (Mundinia) chancei* sp. nov.: identification and characterization. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, p. 1084–1088, 2015.
- KWAKYE-NUAKO, G. et al.** *Leishmania procaviensis* sp. nov.: an emerging cause of visceral leishmaniasis. *Infectious Diseases of Poverty*, v. 12, p. 1–10, 2023.
- LAINSON, R.** The Neotropical *Leishmania* species: a brief review. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, p. 13–32, 2010.
- LEISHVET GROUP.** Clinical guidelines for canine leishmaniosis. *LeishVet*, 2024a.
- LOB-SIGER, M. et al.** *Leishmania siamensis*-like infections in horses: clinical and molecular analysis. *Veterinary Parasitology*, v. 174, p. 1–7, 2010.
- LUKEŠ, J. et al.** Evolutionary history of trypanosomatids: origin and diversification. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 222, p. 11–30, 2018.
- MAIA, C.; CAMPINO, L.** Canine leishmaniasis: epidemiology, clinical aspects and diagnosis. *Veterinary Parasitology*, v. 181, p. 133–147, 2011.
- MANSON-BAHR, P. E. C.; HEISCH, R. B.** *Leishmania adleri* and *Sauroleishmania* infections in reptiles: experimental transmission. *East African Medical Journal*, v. 38, p. 132–135, 1961.
- MANNS, S. et al.** Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiology and control. *Parasites & Vectors*, v. 14, p. 1–15, 2021.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C. N.** Leishmaniose visceral no Brasil: expansão geográfica e desafios. *Clinics in Veterinary Medicine*, v. 22, p. 543–560, 2013.
- MAROLI, M. et al.** The role of sand flies in the transmission of leishmaniasis in the Mediterranean Basin. *Parasites & Vectors*, v. 6, p. 1–18, 2013.
- MARTINS, R. M.** Adaptação de *Lutzomyia longipalpis* a ambientes urbanos no Brasil. 2011. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Estadual Paulista.
- MASLOV, D. et al.** Morphological and phylogenetic revision of Trypanosomatidae. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 60, p. 545–558, 2013.
- MASLOV, D. et al.** Advances in trypanosomatid taxonomy and phylogenetics. *Trends in Parasitology*, v. 35, p. 512–524, 2019.

- MENDES-JUNIOR, A. F. et al.** Atypical *Leishmania* species in Brazil: ecology, taxonomy and epidemiology. *Parasites & Vectors*, v. 16, p. 1–13, 2023.
- MHADHBI, M.; SASSI, A.** *Leishmania* infection in equids: clinical and epidemiological aspects. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 91, p. 103129, 2020.
- MÜLLER, N. et al.** *Leishmania siamensis* in cattle: clinical and molecular characterization. *Parasitology International*, v. 58, p. 140–142, 2009.
- NASCIMENTO, M. D. et al.** Urbanization and expansion of visceral leishmaniasis in Brazil: eco-epidemiological aspects. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 12, p. 1–8, 2014.
- NOBRE, C. A.; SAMPAIO, G.; SALAZAR, L.** Mudanças climáticas e impactos na distribuição de vetores no Brasil. *Revista Brasileira de Climatologia*, v. 8, p. 1–20, 2011.
- ODELL, R. L. et al.** Sand fly ecology and behavior in endemic foci of visceral leishmaniasis. *Journal of Vector Ecology*, v. 37, p. 1–10, 2012.
- OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde.** Leishmaniasis situation in the Americas: epidemiological update. Brasília: OPAS, 2023.
- PEREIRA, A. C.** Análise espacial da expansão da leishmaniose visceral no interior paulista. 2025.
- PINTO, I. S. et al.** Occurrence of *Lutzomyia cruzi* in the State of São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, v. 49, p. 1–4, 2015.
- PINTO, M. C. et al.** Changes in sand fly fauna associated with environmental modifications in endemic areas. *Journal of Medical Entomology*, v. 39, p. 456–460, 2002.
- PIRAJÁ, E.** Estudo de reservatórios silvestres de leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, p. 483–484, 2005.
- PITA-PEREIRA, D. et al.** Natural infection of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 3, p. 1–8, 2010.
- POLO, G. et al.** Environmental drivers of *Lutzomyia longipalpis* distribution in São Paulo. *Acta Tropica*, v. 184, p. 20–32, 2018.
- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.** Transmission, reservoirs and epidemiology of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, v. 136, p. 1915–1934, 2009.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R.** *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.
- RANGEL, E. F.; VILELA, M. L.** *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in Brazil: current status. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 315–318, 2008.
- REIS, L. L. et al.** Trends and spatial distribution of visceral leishmaniasis in Brazil, 2001–2012. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 107, p. 1–10, 2013.

- RODRIGUES, A. C. et al.** First report of *Lutzomyia migonei* naturally infected with *Leishmania infantum* in an endemic area. *Acta Tropica*, v. 164, p. 1–5, 2016.
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M.** Wild and synanthropic reservoirs of leishmaniasis in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 3, p. 251–262, 2014.
- ROSÁRIO, I. N. et al.** Ecological aspects of *Lutzomyia* species in urban transmission areas. *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 1–12, 2014.
- ROTUREAU, B.** Ecology of sylvatic reservoirs of *Leishmania*. *Medicina (Buenos Aires)*, v. 66, p. 27–33, 2006.
- RONDÓ, P. H. C. et al.** Distribution and dynamics of visceral leishmaniasis in São Paulo State. *Revista Paulista de Pediatria*, v. 31, p. 1–7, 2013.
- RITTENHOUSE, M. et al.** Ecology and behavior of sand flies in transmission areas of visceral leishmaniasis. *Journal of Vector Ecology*, v. 32, p. 23–28, 2007.
- SALOMÓN, O. D. et al.** Urbanization of visceral leishmaniasis and climate factors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, p. 831–846, 2015.
- SANTOS, T. V.** Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no Brasil. 2019.
- SCHÖNIAN, G. et al.** PCR diagnosis and characterization of *Leishmania*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 3147–3153, 2003.
- SILVA, M. A. et al.** Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in São Paulo: trends and spatial analyses. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 20, p. 1–13, 2017.
- SINCLAIR, A. N.; DE GRAFFENRIED, C. L.** Cell biology of kinetoplastids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 214, p. 1–13, 2019.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al.** LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, v. 4, p. 86, 2011.
- SOUZA, A. I. et al.** Environmental changes and expansion of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, p. 1291–1301, 2008.
- SOUZA, N. A.; BRASIL, R. P.; WILSON, M. L.** *Phlebotominae* as vectors of leishmaniasis: biology and behavior. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 122, p. 20–35, 2017.
- TALMI-FRANK, D. et al.** *Leishmania tropica* infection in golden jackals: implications for urban cycles. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, p. 2009–2012, 2012.
- TAYLOR, K. et al.** Mammalian infectivity of reptile *Leishmania*: experimental insights. *Parasitology*, v. 137, p. 1–10, 2010.
- TORRES-GUTIÉRREZ, C. et al.** Cryptic diversity of *Lutzomyia* species in Brazil revealed by DNA barcoding. *Parasites & Vectors*, v. 5, p. 1–12, 2012.

- URBANO, P. et al.** Urban ecology and sandfly adaptation in metropolitan environments. *Urban Ecosystems*, v. 21, p. 1–12, 2018.
- VASCONCELOS, I. A.; SILVA, R. A.; RANGEL, E. F.** Expansão da leishmaniose visceral no Sudeste brasileiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 24, p. 42–50, 2015.
- VICKERMAN, K.** The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *International Journal for Parasitology*, v. 24, p. 1317–1331, 1994.
- VOTÝPKA, J. et al.** Diversity of trypanosomatids in insects. *International Journal for Parasitology*, v. 45, p. 389–402, 2015.
- WALLACE, F. G.** The trypanosomatid parasites of insects. *Experimental Parasitology*, v. 18, p. 124–193, 1966.
- WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K.** The cell biology of trypanosomes. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, p. 147–156, 2013.
- YURCHENKO, V. et al.** Taxonomic revision of Trypanosomatidae: implications for Leishmaniinae. *Protist*, v. 174, p. 1–17, 2023.
- ZANETTI, A. S. et al.** Environmental suitability for *Lutzomyia longipalpis* in São Paulo: modeling approaches. *Acta Tropica*, v. 200, p. 1–9, 2020.
- ZUMMO, S.; DELLA TORRE, A.** Sand fly ecology in Mediterranean and American regions. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 16, p. 1–10, 2002.
- ZUBEN, A. P. B.; DONALISIO, M. R.** Vigilância e controle da leishmaniose visceral: desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 19, n. 4, p. 727–740, 2016.