



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

JANILENE DE OLIVEIRA NASCIMENTO

Monitoramento terapêutico de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* tratados com marbofloxacina combinada ao alopurinol

RECIFE-PE

2023



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

JANILENE DE OLIVEIRA NASCIMENTO

Monitoramento terapêutico de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* tratados com marbofloxacina combinada ao alopurinol

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientador: Leucio Câmara Alves

RECIFE-PE

2023



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

Monitoramento terapêutico de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* tratados com marbofloxacina combinada ao alopurinol

Tese de doutorado elaborado por:

JANILENE DE OLIVEIRA NASCIMENTO

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE
Orientador

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Vitor Márcio Ribeiro
Vice-presidente do BRASILEISH

Prof. Dr. Fábio dos Santos Nogueira
Fundação Educacional de Andradina (FEA)

Dr. Claudio Nazaretian Rossi
Gerente Técnico Nacional PET - CEVA Saúde Animal

Profa. Dra. Gílcia Aparecida de Carvalho
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE)

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

- N244m Nascimento, Janilene
Monitoramento terapêutico de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* tratados com marbofloxacina combinada ao alopurinol / Janilene Nascimento. - 2023.
74 f. : il.
- Orientador: Leucio Camara Alves.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2023.
1. Leishmaniose canina. 2. tratamento. 3. PCR quantitativa. 4. fluorquinolona. I. Alves, Leucio Camara, orient. II. Título

CDD 636.089

“O mundo é um livro e quem fica sentado em casa lê somente uma página.”

Santo Agostinho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a uma luz divina que me guia nessa breve caminhada na terra. Obrigado por me fazer não desistir tão facilmente diante dos obstáculos da vida.

Á Roseane Feitosa, pela força, paciência e companheirismo. Obrigada por acreditar na minha capacidade, amo-te.

Aos meus familiares (principalmente meus irmãos: Camila Oliveira e Elivania Jr. Oliveira) que mesmo na distância, sempre me desejaram sucesso e acreditaram na minha capacidade.

Ao professor Dr. Leucio Câmara Alves, meu orientador, pela paciência, ensinamentos diários e conversas, algumas vezes mais sérias, mas que foram essenciais para o meu crescimento profissional. Obrigado por acreditar em mim!

A minha psicóloga, Juliana Barros, responsável por me guiar nos momentos tensos e difíceis e me ensinar a trilhar o caminho do equilíbrio e inteligência emocional.

Á Dra. Milena Paiva, por me aceitar em seu célebre grupo (incluindo Isabella e Jade) para a execução de algumas etapas da metodologia da tese. Desejo-lhe muitas bênçãos em sua vida.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Doenças Parasitárias, pelos momentos compartilhados, pelas risadas e ensinamentos ao longo da trajetória. Especialmente a Dra. Renata Pimentel e Dra Carina Lucena pelos conhecimentos que valorizaram minha qualificação de tese.

Aos tutores dos cães, que disponibilizaram seu tempo para inserir seu animal na pesquisa e administrar os medicamentos de forma cuidadosa. Pacientes esses que me ajudaram e incentivaram para que eu continuasse a fazer essa pesquisa.

Á Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco pelo financiamento da bolsa acadêmica.

Finalmente, se eu esqueci algum nome, saiba que agradeço a você que diretamente ou indiretamente contribuiu com esse trabalho.

Obrigada!

RESUMO

O tratamento de cães infectados por *Leishmania infantum* tem sido um desafio para o médico veterinário, por ser uma terapia dispendiosa e a longo prazo com opções terapêuticas limitadas. Nesse sentido, o tratamento da leishmaniose canina (Lcan) requer monitoramento laboratorial, para acompanhar a resposta clínica, imunológica e da carga parasitária. O estudo teve como objetivo avaliar clínica, carga parasitária e perfil da produção de anticorpos no monitoramento terapêutico em cães com infecção natural por *L. infantum*. Foram utilizados 26 cães com diagnóstico parasitológico positivo (formas amastigotas de *Leishmania*) e divididos em dois grupos de tratamento: G1- 15 animais tratados com marbofloxacina e alopurinol e G2: 11 animais com miltefosina. Os cães foram monitorados durante 6 meses, com avaliações clínicas nos dias D0, D30, D90 e D180, sendo a sorologia quantitativa realizada apenas no início e final do tratamento. Os parâmetros clínicos foram classificados de acordo com a gravidade em uma escala de 0 a 3. A qPCR foi baseada na amplificação de *L. infantum* do minicirculo do cinetoplasto (kDNA). Os animais do G1 e G2 apresentaram 86,6% e 45,4% de redução nos escores clínicos nos primeiros três meses, respectivamente. A recidiva dos sinais clínicos foi observada em 9,1% do G2. Os títulos de anticorpos diminuíram em 93,3% com o uso da marbofloxacina e alopurinol, contra 63,6% utilizando miltefosina ao final do estudo (D180). No G1 (D0), a média do número de parasitos/ μL na medula óssea foi de 239.267 com uma mediana de 13.792 parasitos/ μL . No grupo da miltefosina, a média foi de 965.795,1 parasitos/ μL com mediana de 117,8 parasitos/ μL . A marbofloxacina com alopurinol mostrou-se viável para a redução da carga parasitária. O acompanhamento durante seis meses de cães tratados com marbofloxacina e alopurinol permitiu observar uma melhora clínica significativa, com cura clínica em 20%. Na tentativa de uma melhor resposta terapêutica, a proposta inédita da combinação de marbofloxacina e alopurinol, demonstrou um potencial protocolo para o uso em cães com Lcan, principalmente no Brasil, pois só existe uma medicação licenciada para tal, com efeitos gastrintestinais presentes. Porém, novos estudos poderão demonstrar a redução da infectividade em cães.

Palavras chave: Leishmaniose canina; tratamento; PCR quantitativa; fluorquinolona.

ABSTRACT

The treatment of dogs infected with *Leishmania infantum* has been a challenge for the veterinarian, because it is an expensive and long-term therapy with limited therapeutic options. Thus, the treatment in canine leishmaniasis requires laboratory monitoring, as clinical and immunological response and parasite load of the dog. The objective of this study was to evaluate the combination of marbofloxacin and allopurinol from a clinical perspective and antibody production profile in therapeutic monitoring for CanL (Canine Leishmaniasis). Twenty-six dogs with positive parasitological diagnosis (amastigotes forms the *Leishmania*) were divided into two treatment groups: G1 - 15 animals treated with marbofloxacin and allopurinol, and G2 - 11 animals treated with miltefosine only. The dogs were monitored for 6 months with clinical evaluations on days D0, D30, D90, and D180, and quantitative serology was performed only at the beginning and end of treatment. Clinical parameters were classified according to severity on a scale of 0 to 3. The qPCR was based on the amplification of *L. infantum* kDNA (kinetoplast minicircle). In the first three months, animals in G1 and G2 showed reductions of 86.6% and 45.4%, respectively, in clinical scores. Clinical signs relapsed in 9.1% of G2. At the end of treatment, the mean reduction in clinical scores was 61.3% for G1 and 22.3% for G2. Antibody titers decreased by 93.3% with the use of marbofloxacin and allopurinol, compared to 63.6% using miltefosine alone at the end of treatment. In both groups, dogs with high clinical scores had high antibody titers (D0), and as clinical scores decreased on D180, antibody titers also significantly reduced ($H = 19.2506$; $p = 0.0002$). *Prior to the start of treatment, the mean number of parasites/ μ L in the bone marrow was, for G1, 239,267 with a median of 13,792 parasites/ μ L. In G2, the mean was 965,795.1 parasites/ μ L with a median of 117.8 parasites/ μ L.* Marbofloxacin with allopurinol proved to be viable for reducing parasite load. Monitoring dogs treated with marbofloxacin and allopurinol for six months allowed us to observe a significant clinical improvement, with clinical cure in 20%. In an attempt to achieve a better therapeutic response, the unprecedented proposal for the combination of marbofloxacin and allopurinol demonstrated a potential protocol for use in dogs with Lcan, mainly in Brazil, as there is only one medication licensed for this, with gastrointestinal effects present. However, new studies may demonstrate a reduction in infectivity in dogs.

Keywords: Canine leishmaniasis; treatment; polymerase chain reaction; fluoroquinolone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Formas de desenvolvimento de <i>Leishmania</i>	12
Figura 2. Ciclo da <i>Leishmania infantum</i>	13
Figura 3. Immunopatogenia da Lcan.....	14
Figura 4. Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp em pele de cão.....	17

CAPÍTULO I

Figura 1. Desenho experimental.	41
Figura 2. Redução dos sinais clínicos ao longo do tratamento dos cães.....	43
Figura 3. Números absolutos de títulos de anticorpos momentos D0 e D180 de cães no G1 e G2.	44
Figura 4. Pontuação de escores clínicos e títulos de anticorpos nos momentos D0 e D180 de cães submetidos ao tratamento no grupo 1 (G1) e 2 (G2)	45

CAPÍTULO II

Figura 1. Números absolutos de <i>Leishmania</i> / μL^* em amostras de medula óssea nos momentos D0 e D180 de cães no G1 e G2.....	53
---	----

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

AINEs - anti-inflamatórios não esteroidais

CEUA - Conselho de ética no Uso de Animais

DNDI - Medicamentos para Doenças Negligenciadas.

DPP® - *Dual Path Platform*

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

IFN- γ - Interferon-gama

IgG1 - Imunoglobulina de subclasse 1

Hovet - Hospital Veterinário

IL-12 - Interleucina 12

IL-2 - Interleucina 2

LT - Leishmaniose tegumentar

LV - Leishmaniose Visceral

Lcan - Leishmaniose Canina

MAPA - Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal

OMS - Organização Mundial da Saúde

ON - óxido nítrico

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

SRD – Sem raça definida

Th1 – Célula T auxiliar do tipo I

Th2 – Célula T auxiliar do tipo II

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	9
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	10
1.INTRODUÇÃO.....	9
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Leishmaniose Visceral (LV)	11
2.2 Agente etiológico e ciclo biológico	11
2.3 Leishmaniose Canina (Lcan).....	13
2.3.1 Imunopatogenia	14
2.2.3 Manifestações clínicas.....	15
2.2.4 Diagnóstico	17
2.2.4.1 Diagnóstico parasitológico	17
2.2.4.2 Diagnóstico sorológico.....	18
2.2.4.3 Diagnóstico molecular.....	18
2.2.4 Tratamento	19
3. REFERÊNCIAS	23
4.OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo geral.....	34
4.1 Objetivos específicos	34
CAPÍTULO I.....	36
1. INTRODUÇÃO.....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 Aspectos éticos.....	39
2.2 Critérios de exclusão e inclusão	39
2.4 Desenho experimental.....	40
2.5 Avaliação clínica	41
2.6 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	41
2.7 Análise dos dados	42
3. RESULTADOS	42
3.1 Avaliação clínica.....	42
3.2 Títulos de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	44
4. DISCUSSÃO	45
5 REFERENCIAS	47
CAPÍTULO II.....	53
1.1 INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS	56

2.1 Aspectos éticos.....	56
2.2 Animais e critérios de exclusão e inclusão	56
2.3 Protocolo experimental	57
2.4 Coletas de medula óssea	57
2.5 Carga parasitária - qPCR	58
2.6 Análise dos dados	58
3. RESULTADOS	59
3.1 Carga parasitária	59
4. DISCUSSÃO	59
5. REFERENCIAS	61

1.INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, dos quais 20 espécies podem causar doenças e são transmitidas a animais e humanos por vetores da família Psychodidae (OMS, 2022). Com distribuição mundial em 99 países, esta zoonose emergente se apresenta de duas formas, a saber leishmaniose tegumentar (LT), que afeta a pele e as mucosas, e leishmaniose visceral (LV) que acomete vários órgãos internos (OMS, 2022).

Devido à sua gravidade, a LV é considerada uma das cinco doenças negligenciadas prioritárias para a eliminação. Em 2020, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen (OMS, 2022).

No Brasil, a LV está distribuída em todo o território e a região Nordeste detém o maior número de casos (JUNIOR, 2018). Nessas áreas, *Leishmania infantum* é transmitida particularmente pelo inseto vetor *Lutzomyia longipalpis*, sendo o cão o principal reservatório em ambientes urbanos (ALVAR et al., 2012; JUNIOR, 2018; CUNHA et al., 2022).

A Leishmaniose canina (Lcan) é considerada uma doença imunomediada com manifestações clínicas variáveis e inespecíficas ou muitas vezes ausentes (MIRÓ et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Nesse cenário, o diagnóstico é muitas vezes complexo, sendo realizado por exames clínicos, parasitológicos, sorológicos e moleculares (MORALES-YUSTE, MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022).

Nos cães, o uso de medicamentos anti-*Leishmania* tem sido um desafio, por serem onerosos e com opções terapêuticas limitadas. No Brasil, a única medicação leishmanicida licenciada é a miltefosina e pode ser combinada principalmente com alopurinol (REGUERA et al., 2016; MAPA, 2016).

De um modo geral, esses fármacos são utilizados para a redução dos sinais clínicos e da carga parasitária, sendo difícil alcançar uma cura parasitológica, o que explica as constantes recidivas dos quadros clínicos (BANETH SOLANO-GALLEGO; 2022). Com isso, o tratamento de cães com leishmaniose requer monitoramento laboratorial como a sorologia quantitativa e carga parasitária, além do estadiamento

clínico periódicos (BRASILEISH, 2018; DANTAS-TORRES et al., 2019; BANETH SOLANO-GALLEGO; 2022).

A reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) representa grande avanço nos métodos moleculares, particularmente por facilitar a quantificação da carga parasitária em determinado tecido biológico, enquanto a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) tem sido utilizada para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (GALLUZZI et al., 2018; DANTAS-TORRES et al., 2019).

As frequentes recidivas da doença sugerem a busca por novos medicamentos ou abordagens terapêuticas. Por isso, terapias alternativas como marbofloxacina também estão descritas no tratamento da Lcan (ROUGIER et al., 2008; ROUGIER et al., 2012; PINEDA et al., 2017).

Esse fármaco tem ação leishmanicida e propriedades imunomoduladoras em estudos *in vitro* (DALHOFF, SHALIT, 2003; VOULDOUKIS et al., 2006; AMANTE et al, 2020). Porém, não existe registros de estudos *in vivo* desse fármaco combinado ao alopurinol, sabe-se que os benefícios alcançados com as combinações de drogas estão relacionados a um aumento da meia-vida da droga, sinergismo, toxicidade parasitária direta e melhores respostas imunológicas em hospedeiros infectados (BASTOS et al., 2022).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o monitoramento terapêutico de cães com infecção natural por *L. infantum* tratados com marbofloxacina combinado ao alopurinol, sob o ponto de vista clínico, carga parasitária e perfil da produção de anticorpos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral (LV)

A LV é uma doença parasitária reemergente, cosmopolita e que acomete os animais silvestres, domésticos e os humanos (GUIMARÃES et al., 2017; KASHIF et al., 2017; SOLANO-GALLEGO et al., 2017). A transmissão ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (ALVAR et al., 2004).

Segundo a OMS, há 50.000 a 90.000 novos casos de LV por ano em todo o mundo (OMS, 2020). Essa zoonose é endêmica em 80 países e com mais de 600 milhões de pessoas em risco no mundo com apenas 25 a 45% dos casos relatados à OMS (DNDI, 2022).

O Brasil é um dos países com o maior número de casos anuais e cerca de 96% dos casos na América Latina (OMS, 2022). Essa crescente expansão com aparecimento de novos focos endêmicos, ocorre principalmente pelo crescimento desordenado das metrópoles, aumento de sinantrópicos das áreas urbanas e condições precárias de moradia, como falta de gerenciamento de resíduos sólidos ou descargas de esgoto a céu aberto, que podem aumentar a população dos flebotomíneos (LEITE et al., 2021; OMS, 2022).

No território brasileiro, o cão é o principal reservatório urbano de *Leishmania infantum*, em virtude de uma alta carga parasitária na pele e estreita relação com o ser humano (HARHAY et al., 2011; LAURENTI et al., 2013; ARUMUGAM, SCORZA, PETERSEN, 2022).

Entretanto, outros hospedeiros podem estar envolvidos no ciclo urbano e periurbano, como o gato doméstico (ASFARAM, FAKHAR, 2019), roedores e marsupiais sinantrópicos (CARREIRA et al., 2012; FERREIRA et al., 2015), muares e asininos (LIMEIRA et al., 2021), cachorro do mato (SOARES et al., 2017) e morcegos (DE OLIVEIRA et al., 2015; DE REZENDE et al., 2017).

2.2 Agente etiológico e ciclo biológico

O agente etiológico da LV é um protozoário pertencente à ordem *Trypanosomatida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (SHAW, 1994),

sendo conhecidas aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* que causam a enfermidade em humanos (KASPER et al., 2015; OMS, 2022) e 12 espécies que causam a enfermidade em animais (TREVISAN et al., 2015). Nas Américas, a *Leishmania infantum* é a espécie comumente envolvida na transmissão da LV (ALVAR et al., 2012).

O ciclo biológico é do tipo heteroxeno, com participação de dois hospedeiros, o flebotomíneo, que apresenta a forma promastigota (Figura 1) no seu intestino, e um hospedeiro definitivo mamífero, que possui a forma ovoide não móvel, denominada de amastigota (KASPER et al., 2015).

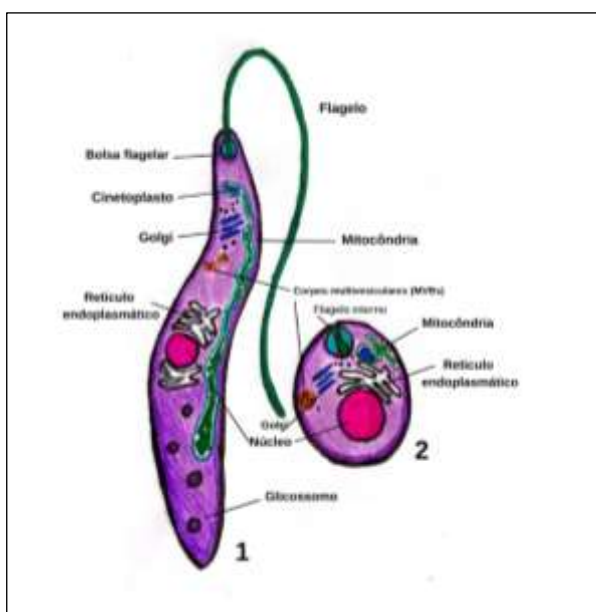


Figura 1. Formas de desenvolvimento de *Leishmania*. 1: promastigota 2: amastigota
Fonte: Nascimento (2023)

O principal modo de transmissão de *L. infantum* (Figura 2) para os hospedeiros é através da inoculação de formas promastigotas metacíclicas pelo vetor, que são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dessas células, as promastigotas se diferenciam em amastigotas e posteriormente fazem divisão binária até que ocorra o rompimento da célula hospedeira, liberando as amastigotas no organismo e que serão fagocitadas por novos macrófagos, assim o cão parasitado é fonte de infecção para um novo vetor (GRAMICCIA, GRADONI, 2005; PALTRINIERI et al., 2010).

No momento do repasto sanguíneo, em um cão infectado, o vetor ingere as formas amastigotas do parasito que ao chegar no intestino, sofrem divisão binária e modificam-se em formas promastigotas. Após, ocorre a metaciclógenese (promastigotas metacíclicas) e essas formas infectantes migram para a probóscide para serem inoculados com a saliva por ocasião do hematofagismo do inseto vetor (GRAMICCIA, GRADONI, 2005; PALTRINIERI et al., 2010).

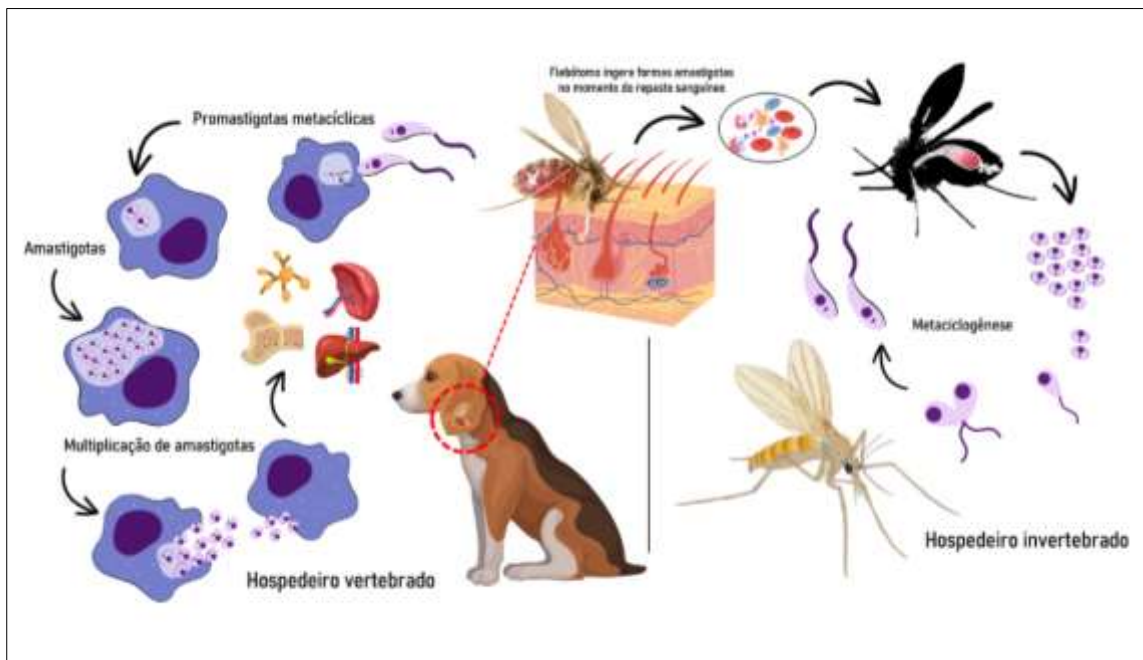


Figura 2. Ciclo da *Leishmania infantum*.
Fonte: Nascimento (2023)

2.3 Leishmaniose Canina (Lcan)

A Lcan é endêmica em mais de 70 países (KASZAK, PLANELLAS, DWORECKA-KASZAK, 2015; DANTAS-TORRES et al., 2012; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022). No continente americano, a infecção canina tem sido observada desde o Canadá até à Argentina (DE ALMEIDA, SPANN, BRADBURY, 2020) e pode estar relacionado com a circulação de cães infectados entre diferentes regiões, adaptação de populações de flebotômios em áreas previamente livres e falhas nas estratégias atuais de controle (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012; SATRAGNO, 2017; DANTAS-TORRES et al., 2019).

A *Lcan* é transmitida principalmente pelo *Lutzomyia longipalpis* (ALVAR et al., 2012; JUNIOR, 2018; CUNHA et al., 2022), porém outras formas de transmissão como vertical, sexual e por meio de transfusão de sangue foram relatadas (SLIMANE et al., 2014; TOEPP et al., 2019; SILVA et al., 2020).

Nos cães, a doença é sistêmica, crônica e se apresenta de forma assintomática ou sintomática com sinais clínicos variáveis, fato este que resulta em um diagnóstico muitas vezes complexo (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; MAIA; CAMPINO, 2012; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022).

2.3.1 Imunopatogenia

A inoculação de formas infectantes de *L. infantum* (Figura 3) com a saliva do vetor recruta células fagocíticas, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, criando um ambiente pró-inflamatório (PEREIRA et al., 2017). Estudos *in vitro* demonstraram que os neutrófilos são células efetoras com capacidade de controlar a infecção inicial e contribuem para a eliminação do parasito, por meio de uma série de mecanismos, incluindo fagocitose, geração de explosão oxidativa e extrusão de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (LEAL et al., 2014; PEREIRA et al., 2017).

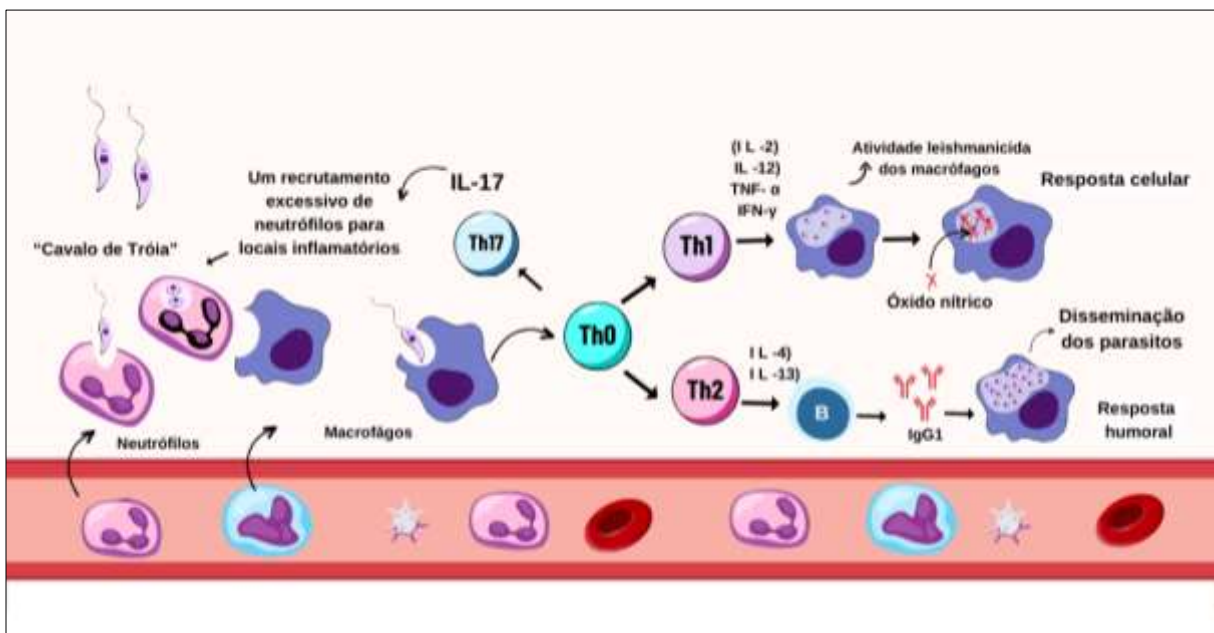


Figura 3. Imunopatogenia da Lcan.
Fonte: Nascimento (2023)

Por outro lado, as células Th17 (célula auxiliar T CD4+) promovem respostas de defesa principalmente pela produção de IL-17, que pode levar a um recrutamento excessivo de neutrófilos para locais inflamatórios e aumentar ligeiramente a expressão de IL-8, responsável por promover a persistência do parasito, por meio do acúmulo maciço e duradouro de neutrófilos (ZEILHOFER, SCHORR, 2000, TOEPP, PETERSEN, 2020).

Os neutrófilos, ao fagocitarem parasitos, podem sofrer apoptose e serem ingeridos por macrófagos, que assim serão infectados pelo parasito. Essa hipótese é conhecida como “*Cavalo de Tróia*”, pois permite uma entrada silenciosa da *Leishmania* sem ativação do macrófago (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; CARREIRA; DA SILVA, 2021).

Os cães assintomáticos, são mais resistentes a infecção, porque há um predomínio da resposta dos linfócitos T (CD4+) auxiliares do tipo 1 (Th1). Essas células são consideradas pró-inflamatórias e secretam principalmente as interleucinas-2 (IL-2) e 12 (IL-12), fator de necrose tumoral (TNF- α) e IFN- γ , que limitam a infecção e a resposta inflamatória associada ao aumento da atividade leishmanicida dos macrófagos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; TOEPP, PETERSEN, 2020; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022).

Leishmania sp é capaz de modular a resposta imunológica, inibindo a produção de IL-12 a qual é essencial para uma resposta Th1, conhecida por suas funções leishmanicidas (LIU, UZONNA, 2012). Ao ocorrer, uma falha na produção de IL-12, há predomínio da resposta de linfócitos T (CD4+) auxiliares do tipo 2 (Th2), que liberam citocinas IL-4 e IL-13 e linfócitos B com aumento da produção de IgG1 e consequente hipergamaglobulinemia (DESCHACHT, 2012; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022; OLÍAS-MOLERO et al., 2020; GARCÍA-CASTRO et al., 2022).

2.2.3 Manifestações clínicas

Após a infecção, os sinais clínicos podem surgir entre três meses a sete anos (SALANT et al., 2021), a depender do tipo de resposta linfocítica imune estabelecida (GARCIA et al., 2022). A presença de macrófagos infectados por *L. infantum* em diversos tecidos causa reações inflamatórias granulomatosas particularmente em

fígado, baço, medula óssea e pele (ABBEHUSEN et al., 2017; MORALES-YUSTE, MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022).

A maioria dos sinais clínicos é decorrente da produção exacerbada de imunocomplexos, e está relacionada principalmente à patogênese da nefropatia, sinais oftalmológicos e artropatias (WANG, WANG, WEN, 2019; GIZZARELLI et al., 2020; ROURA et al., 2020). Além da perda de peso, a atrofia muscular pode estar presente pela natureza catabólica da doença e alterações imunológicas associadas à infecção por *L. infantum* (PACIELLO et al., 2009; MORALES-YUSTE, MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022).

A linfadenomegalia com aspecto inicial exsudativo evolui para proliferativo hiperplásico (LUVIZOTTO, 2006). As alterações na medula óssea variam de acordo com o estágio da infecção e podem se manifestar como granulocitose, displasia eritroide ou hipoplasia (MOMO et al., 2014).

A pele é o principal órgão envolvido na Lcan (MORALES-YUSTE, MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022), pois a presença de parasitos é primordial para a transmissão ao vetor. As lesões cutâneas mais frequentes nos cães com infecção por *L. infantum* são as esfoliativas, papulares, nodulares e ulcerativas, além de alopecia e onicogribose (ALVAR et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2011, SOLANO-GALLEGO et al., 2017; NOLI, AUXILIA, 2005; PALTRINIERI et al., 2016; KOUTINAS, KOUTINAS et al., 2014). A onicogribose, ou crescimento das unhas, é muito comum e está associada à dermatite liquenoide e mononuclear de interface na ausência de parasitas (KOUTINAS, KOUTINAS et al., 2014).

As manifestações oculares na Lcan são diversas, com prevalência variando de 16% a 92%, ao quais podemos destacar: blefarites, ceratoconjuntive seca ou não, uveites, conjuntivites folicular ou membranosa (FREITAS et al., 2017, ALI et al., 2021, GOULLI et al., 2023). Essas alterações são ocasionadas pela decorrência de infiltrado linfoplasmocitário perivascular em resposta à presença do protozoário (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; GOULLI et al., 2023).

Os sinais neurológicos na Lcan descritos são variados e incluem convulsões, cegueira, sinais vestibulares e cerebelares, paraparesia, tetraparesia, tetraplegia e mioclonia (MACAU et al., 2017, ZOBBA et al., 2017, PORTEIRO et al., 2021).

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da Lcan é complexo pela variedade de sinais clínicos e alterações laboratoriais, sendo necessária uma combinação de testes parasitológicos, sorológicos e moleculares (MAIA; CAMPINO, 2012; SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

2.2.4.1 Diagnóstico parasitológico

A observação direta do parasito (Figura 4) representa o padrão-ouro para o diagnóstico da doença por apresentar alta especificidade e baixo custo (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Porém, a sensibilidade pode ser influenciada principalmente pela carga parasitária, coletas malsucedidas e tipo de material biológico (REGINA-SILVA et al., 2014; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022).

Estudos demonstraram sensibilidade de 93-99% em aspirados de baço, 52-85% na medula óssea, 52-58% para linfonodos e 42,2% em pele (MARCELINO et al., 2020; OIE, 2021). A aspiração de medula óssea é menos sensível se comparado com o baço, porém mais segura (OIE, 2021).

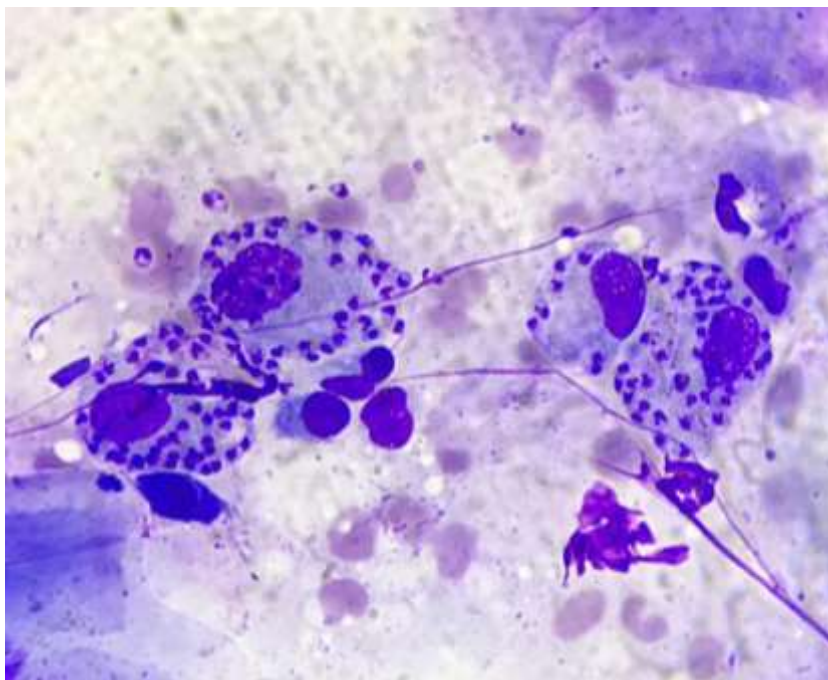


Figura 4. Formas amastigotas de *Leishmania* sp em pele de cão – aumento de 1000x)
Fonte: Nascimento (2021)

2.2.4.2 Diagnóstico sorológico

A sorologia é uma importante técnica diagnóstica, regularmente utilizada na clínica de pequenos animais e para inquéritos epidemiológicos, no entanto, esse método deve ser interpretado com cautela, podendo ocorrer a presença de reações cruzadas com *Leishmania braziliensis* (SAMPAIO et al., 2021) e outros tripanossomatídeos como *Trypanosoma caninum* e *Trypanosoma cruzi* (ALVES et al., 2012; ZANETTE et al., 2014) e alguns patógenos como *Toxoplasma gondii* (ZANETTE et al., 2014), *Babesia canis* (LAURENTI et al., 2014) e *Ehrlichia canis* (OLIVEIRA et al., 2008; ZANETTE et al., 2014).

No Brasil, o exame de triagem recomendado pelo Ministério da Saúde é o imunoenensaio cromatográfico rápido em plataforma de duplo percurso (Dual Path Platform -DPP® – BioManguinhos/ Fundação Oswaldo Cruz) e como teste confirmatório o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA- EIE-LVC Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) (GRIMALDI et al., 2012; BRASIL, 2014). O DPP possui as vantagens de ser um teste rápido, de fácil execução e com resultados fáceis de interpretar (GRIMALDI et al., 2012).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é uma técnica quantitativa comumente utilizada para o diagnóstico (DOS REIS et al., 2023) e o estadiamento de cães infectados por *L. infatum* (PALTRINIERI et al., 2016; BRASILEISH, 2018; PROVERBIO et al., 2014). Entretanto, é importante salientar que a soroconversão em cães infectados, pode ocorrer de 4 a 22 meses com tempo médio de 10,5 meses após a infecção (OLIVA et al., 2006). Assim, os testes sorológicos não são recomendados para uma detecção precoce da infecção, sendo utilizados nesses casos os métodos moleculares (MAIA, CAMPINO, 2008; COURA- VITAL et al., 2013).

2.2.4.3 Diagnóstico molecular

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) constitui uma ferramenta sensível para o diagnóstico da infecção por *Leishmania*, com sensibilidade e especificidade próximas de 100% (SOLCÀ et al., 2012; SILVEIRA et al., 2018). Uma das vantagens dessa técnica é a variedade de amostras que podem ser analisadas, como medula óssea, linfonodos, baço, pele e suabe conjuntival. Amostras de sangue e urina são menos invasivas, entretanto, menor sensibilidade ao teste (SOLANO-GALLEGÓ et al.,

2009; MORALES-YUSTE, MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022; SERENO et al., 2020).

Uma variação da PCR convencional é a PCR em tempo real (qPCR), que permite quantificar a concentração do DNA da amostra e é amplamente utilizada para o monitoramento da carga parasitária de cães tratados (DOS SANTOS NOGUEIRA et al., 2019; MEDKOUR, et al., 2020). Em estudos de carga parasitária de *L. infantum*, a qPCR mostrou uma sensibilidade de 93,33% e uma especificidade de 100% (HOSSAIN et al., 2017).

2.2.4 Tratamento

No contexto atual, antes da terapia anti-*Leishmania*, os cães são classificados de acordo com o estágio clínico, principalmente com base na sorologia quantitativa, achados laboratoriais relacionados à doença renal progressiva, gravidade das lesões e alterações analíticas dos casos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; NOGUEIRA, RIBEIRO, 2015). No Brasil, o estadiamento clínico dos animais infectados é proposto por Brasileish (2018) sendo fundamental para estabelecer o tratamento ideal em cada estágio (Anexo 1).

A escolha da melhor terapia depende do estadiamento clínico e tem como objetivo reduzir sinais clínicos, carga parasitária e infectividade para o vetor (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022). A cura parasitológica é extremamente difícil na Lcan, mas a carga parasitária pode ser reduzida e acompanhada da cura clínica, desde que ocorra um monitoramento a longo prazo para acompanhar a resposta terapêutica e detectar possíveis recaídas (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BANETH, SOLANO-GALLEGO, 2022).

Dentre as opções terapêuticas, o alopurinol é amplamente utilizado em combinação com outras drogas, principalmente para prevenir a recorrência da doença (YASUR-LANDAU et al., 2016). Apesar disso, há relatos que o uso do alopurinol isolado reduza efetivamente a carga parasitária (NASCIMENTO et al., 2020).

O alopurinol apresenta baixa toxicidade que o torna muito eficaz em cães com danos renais (PLEVRAKI et al., 2006). Contudo, seu uso prolongado pode causar a formação de urolitíase, por ser um análogo da hipoxantina que bloqueia a xantina oxidase, interrompendo o metabolismo das purinas (TORRES, et al., 2011; TORRES, et al., 2016; DIAS, et al., 2020; JESUS et al., 2022).

A terapia antimonial (antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio) é a primeira linha de tratamento leishmanicida em países mediterrâneos, apesar de sua alta toxicidade, sendo sua combinação com alopurinol o protocolo de tratamento de escolha nesta região (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022).

Esse fármaco atua inibindo a enzima fosfofrutoquinase dos protozoários, que é necessária para a oxidação de ácido glicolítico e ácidos graxos, causando sua morte (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022; MORALES-YUSTE, MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022). Apesar dos antimoniais apresentarem uma boa atividade leishmanicida, é um fármaco nefrotóxico e cardiotoxico (MATEO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2020).

No Brasil, o uso dos antimoniais é proibido para o tratamento da Lcan, assim uma alternativa de substituição dos antimoniais é o uso de miltefosina, por ser a única medicação licenciada com ação leishmanicida (MAPA, 2016). Seu uso em combinação com alopurinol ou em monoterapia, promove redução de carga parasitária em cães, com recidiva da doença dentro de quatro a doze meses (DOS SANTOS NOGUEIRA et al., 2019; AYRES, et al. 2022).

Ainda que, seu mecanismo de ação não esteja totalmente elucidado, estudos mostram que a atividade da miltefosina está associada à ligação lipídica e ao desencadeamento da apoptose, além de estimular células T elevando os níveis de IFN- γ , estimulando assim a produção de óxido nítrico e radicais reativos de oxigênio, eliminando os parasitos (MANNA et al., 2009; DORLO, et al., 2012; REGUERA et al., 2016).

A anfotericina B é uma droga com atividade antileishmanial efetiva contra diferentes espécies de *Leishmania* spp. que têm relevância clínica nas Américas, tais como como *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (MORAIS-TEIXEIRA, et al., 2014). Seu uso na terapia da Lcan tem uma boa resposta, porém só é recomendado em áreas não endêmicas, devido a preocupações com efeitos colaterais e indução de resistências em casos humanos (BEST et al., 2014).

Outros protocolos terapêuticos têm sido utilizados em diversos ensaios clínicos como imunomoduladores e classes de antibióticos, a exemplo das fluoroquinolonas, representadas pela marbofloxacin (DALHOFF, SHALIT, 2003; VOULDOUKIS et al., 2006; AMANTE et al., 2020). As fluoroquinolonas são conhecidas por apresentarem

propriedades imunomoduladoras, diminuindo a resposta das citocinas em particular (DALHOFF; SHALIT, 2003).

Estudos demonstraram que a marbofloxacina apresenta atividade leishmanicida indireta através do TNF- α e óxido nítrico (ON) via sintase e correlacionadas com a produção de NO₂ (VOULDOUKIS et al., 2006). Segundo Rougier et al. (2012), o tratamento com a marbofloxacina reduziu os sinais clínicos e a carga parasitária de cães com leishmaniose. Além disso, trata-se de fármaco seguro para pacientes com doença renal crônica e apresenta poucos ou nenhum efeito gastrointestinal (PINEDA et al., 2017; ROUGIER et al., 2012).

O tratamento da Lcan com imunomoduladores é uma alternativa para reduzir os sinais clínicos e a carga parasitária, um bom exemplo é a domperidona com propriedades imunoestimulantes através da secreção de prolactina, que atua como agente pró-inflamatório (GOMEZ-OCHOA et al., 2009; SABATÉ et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014).

Estudos demonstraram que a domperidona é capaz de reduzir sinais clínicos em 86% de cães acometidos por leishmaniose e diminuição dos títulos de anticorpos séricos em 38%, além de melhorar a função renal reduzindo as gamaglobulinas (GOMEZ-OCHOA et al., 2009; CAVALERA et al., 2021).

Há um grande interesse em terapias anti-*Leishmania* de uso oral, sendo o fluconazol, cetoconazol e itraconazol alternativas que satisfazem este requisito (GALVÃO; RABELLO; COTA, 2017). Estes agentes demonstraram ser altamente eficazes contra *Leishmania* spp tanto em testes *in vitro* (SHOKRI et al., 2017; BEACH; GOAD; HOLZ, 1988) quanto *in vivo* (EL-SAYED, ANWAR, 2010). Entretanto, não há estudos suficientes para recomendar o uso dessas drogas unicamente como terapia para *Leishmania* (GALVÃO; RABELLO; COTA, 2017).

O tratamento com pentamidina tem sido utilizado com sucesso para reestabelecer a resposta imunológica cães com LV (LASRI et al., 2003). Enquanto, um estudo piloto com a aminosidina investigou a eficácia e a segurança da administração diária por via subcutânea de aminosidina na dose de 15 mg/kg durante 21 dias em cães sem azotemia ou proteinúria (ATHANASIOU et al., 2012).

O uso de nutracêuticos como imunomoduladores para leishmaniose visceral tem gerado interesse nas abordagens atuais da doença (LOMBARDI et al., 2019; DE SOUSA GONÇALVES et al., 2021). Algumas moléculas de nutrientes como óleo de

peixe, óleo de krill e cogumelos secos foram avaliadas quanto ao seu potencial terapêutico considerando o impacto metabólico dos fatores inflamatórios e parasitários da Lcan (CORTESE et al., 2015; MASTELLONE et al., 2020; SOUSA GONÇALVES et al., 2021).

Os nucleotídeos dietéticos modulam a resposta imune Th1 na Lcan e poderiam ser parte de uma estratégia de manejo imunomodulador para pacientes com leishmaniose (RIBEIRO et al., 2018; SEGARRA, 2021). Sua combinação com AHCC (extrato padronizado de micélio cultivado *de* *Lentinula edodes*) também foi testada em cães com melhorias significativas nos escores clínicos e nos biomarcadores usados para monitorar a resposta ao tratamento (SEGARRA et al., 2021; JESUS et al., 2022).

Recentemente, foi proposto o uso do artesunato como uma boa alternativa de quimioterapia para Lcan, apesar de novos ensaios clínicos serem necessários para confirmar esses resultados, como por exemplo, se os cães permanecem infecciosos para os flebotomíneos e quanto tempo de duração no tratamento (MEDKOUR et al., 2020).

A resistência aos medicamentos anti-*Leishmania* é um fator fundamental na falha do tratamento, embora outros fatores também contribuam para esse fenômeno, incluindo as coinfeções e doenças autoimunes concomitantes. No Brasil, há dados que indicam um aumento da resistência de *L. infantum* à miltefosina em um cão com LV tratado anteriormente com miltefosina e alopurinol (YASUR-LANDAU et al., 2018; GONÇALVES et al., 2021). Resistência ao alopurinol em combinação com antimonialis com recidiva de doença clínica (PINILLA; GUTIERREZ; FLOREZ, 2022) tem sido demonstrada (YASUR-LANDAU et al., 2016).

Diante do painel descrito, o tratamento esta cada vez mais desafiante devido à complexidade da enfermidade e das poucas opções terapêuticas disponíveis no mercado (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022). Além disso, a OMS sugere que as drogas anti-*Leishmania* exclusivamente usadas para LV humana, não devem ser destinadas à medicina veterinária devido à suspeita de desenvolvimento de resistência a drogas pelo uso em animais (ADEL et al., 2015).

3. REFERÊNCIAS

ABBEHUSEN, M. M. C., *et al.* Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Scientific reports**, 7(1), v. 7, n. 1, p. 15914, 2017.

ADEL, A. *et al.* Estimation of canine Leishmania infection prevalence in six cities of the Algerian littoral zone using a Bayesian approach. **Plos one**, v. 10, n. 3, p. e0117313, 2015.

ALI, K.M. *et al.* Bilateral Panophthalmia as a Late Sequel of Leishmaniasis in Dogs. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 41, n. 1, 2021.

ALVAR, J. *et al.* Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, n. 3, p. 1-88, 2004.

ALVAR J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ALVES, A. S. *et al.* Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in veterinary science**, v. 93, n. 3, p. 1329-1333, 2012.

AMANTE, J. F. D. A. A. *et al.* Marbofloxacin induces leishmanicidal activity and less inflammatory response in *Leishmania chagasi* infected macrophages. **Veterinária e Zootecnia**, v.27, p.1-11, 2020.

ARUMUGAM, S.; SCORZA, B. M.; PETERSEN, C. Visceral leishmaniasis and the skin: Dermal parasite transmission to sand flies. **Pathogens**, v. 11, n. 6, p. 610, 2022.

ASFARAM, S.; FAKHAR, M.; TESHNIZI, S. H. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 2019.

ATHANASIOU, L. V. *et al.* A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. **Acta tropica**, v. 122, n. 3, p. 291-295, 2012.

AYRES, E. D. C. B. S. *et al.* Clinical and parasitological impact of short-term treatment using miltefosine and allopurinol monotherapy or combination therapy in canine visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, 2022.

BANETH G, SOLANO-GALLEGO L. Leishmaniasis. **Veterinary Clinic Small Animals**, v. 52, p. 1359–1375, 2022.

BASTOS, D. S.S. *et al.* Could combination chemotherapy be more effective than monotherapy in the treatment of visceral leishmaniasis? A systematic review of preclinical evidence. **Parasitology**, v. 149, n. 6, p. 751-764, 2022.

BEACH, D. H., GOAD, L. J., HOLZ JR, G. G. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 31, n. 2, p. 149-162, 1988.

BEST, et al. The diagnosis and management of a case of leishmaniosis in a dog imported to Australia. **Veterinary Parasitology**., 2014.

BRASILEISH - Grupo de Estudo em Leishmaniose Animal. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina. Ed. Agitta, Três Lagoas – MS, 2018.

CARREIRA, J. C. A. et al. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & vectors**, vol. 5, p. 1-5, 2012.

CARREIRA, J. C.; DA SILVA, A. V. The Role of Neutrophils in the Interaction with *Leishmania*: Far beyond a Simple Trojan Horse? **Open Journal of Animal Sciences**, v. 11, n. 3, p. 399-421, 2021.

CAVALERA, M. A. et al. Effect of domperidone (*Leisguard*®) on antibody titers, inflammatory markers and creatinine in dogs with leishmaniosis and chronic kidney disease. **Parasites & vectors**, v.14, n.1, p.1-9, 2021.

CORTESE, L. et al. An immune-modulating diet increases the regulatory T cells and reduces T helper 1 inflammatory response in Leishmaniosis affected dogs treated with standard therapy. **BMC veterinary research**, v. 11, p. 1-11, 2015.

COURA-VITAL, W. et al. Canine visceral leishmaniasis: incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 411-417, 2013.

COURTENAY, O. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2583, 2014.

CUNHA, A. E. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Rio Grande do Norte State, Northeastern Brazil-Spatial Analysis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.50, 2022.

DALHOFF A, SHALIT I. Immunomodulatory effects of quinolones. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 6, p. 359-371, 2003.

DANTAS-TORRES F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DANTAS-TORRES, F. et al. Culling dogs for zoonotic visceral leishmaniasis control: The wind of change. **Trends Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 97-101, 2019.

DE ALMEIDA, M. E., SPANN, D. R. BRADBURY, R. S. *Leishmania infantum* in US-born dog. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, p. 1882, 2020.

DE SOUSA GONÇALVES, R. et al. Nutritional adjuvants with antioxidant properties in the treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 298, p. 109526, 2021.

DE OLIVEIRA, F. M. et al. First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. **Acta tropica**, v. 150, p. 176-181, 2015.

DE REZENDE, M. B. et al. Detection of *Leishmania* spp. in bats from an area of Brazil endemic for visceral leishmaniasis. **Transboundary and emerging diseases**, v. 64, n. 6, p. e36-e42, 2017.

DESCHACHT M. et al. Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon *Leishmania* infection. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1429-1437, 2012.

DIAS, Á. F. D. L. R. et al. Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 217, 2020.

DORLO, T.P.C. et al. Miltefosine: A Review of Its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DOS SANTOS NOGUEIRA, F. et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2019.

DOS REIS, A. T. et al. Exposure to and infection by *Leishmania infantum* among domestic dogs in an area of the Cerrado biome, Maranhão, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 39, p. 100851, 2023.

DNDI. **Medicamentos para Doenças Negligenciadas**. Leishmaniose visceral: Desenvolvendo uma nova geração de tratamentos para um dos principais assassinos de parasitas do mundo. Genebra: DNDI, 2022. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/visceral-leishmaniasis>. Acesso em: 21 mai. 2023.

EL-SAYED, M.; ANWAR, A. E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 3, p. 335-340, 2010.

FERREIRA, E.C. et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2015.

- FRANCINO, O., *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.
- FREITAS, M. V. D. M. *et al.* Ocular diseases in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, 2017.
- GALVÃO, E. L.; RABELLO, A.; COTA, G. F. Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. e0186117, 2017.
- GALLUZZI, *et al.* Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 11, p. 1-13, 2018.
- GARCÍA-CASTRO, A. *et al.* Humoral and Cellular Immune Response in Asymptomatic Dogs with Visceral Leishmaniasis: A Review. **Vaccines**, v. 10, n. 6, p. 947, 2022.
- GIZZARELLI, M. *et al.* Assessment of circulating immune complexes during natural and experimental canine leishmaniasis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 273, 2020.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, 2005.
- GRIMALDI JR, G. *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.
- GÓMEZ-OCHOA P. *et al.* Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 259-263, 2009.
- GONÇALVES, G. *et al.* Increased *Leishmania infantum* resistance to miltefosine and amphotericin B after treatment of a dog with miltefosine and allopurinol. **Parasites & Vectors**, v.14, p.1-8, 2021.
- GONÇALVES L.R. *et al.* Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 407-412, 2014.
- GOULLI, A. F. *et al.* Study of ocular manifestations and humoral immune response in eyes of dogs with leishmaniasis. **Veterinary Medicine and Science**, v. 9, n. 2, p. 625-637, 2023.
- GUIMARÃES, A. *et al.* Serosurvey for canine visceral leishmaniasis in rural and urban areas of the Brazilian Legal Amazon. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.21, p.207-208, 2017.

HARHAY, M. O. *et al.* Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**, v.27, n.9, p.403-409, 2011.

HOSSAIN, F. *et al.* Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0185606, 2017.

JUNIOR, F. E. F. L. Cenários da leishmaniose visceral no Brasil. **Simpósio Internacional de Leishmaniose Visceral**, São Paulo, 2018.

JESUS, L. *et al.* Xanthinuria secondary to allopurinol treatment in dogs with leishmaniosis: Current perspectives of the Iberian veterinary community. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 83, p. 101783, 2022.

KASPER, *et al.* **Harrison's Principles of Internal Medicine 19/E (Vol.1 & Vol.2)**. [s.l.] McGraw-Hill Education, 2015.

KASZAK, ILONA; PLANELLAS, MARTA; DWORECKA-KASZAK, Bożena. Canine leishmaniosis - an emerging disease. **Annals of parasitology**, v. 61, n. 2, 2015.

KASHIF, M. *et al.* Screening of novel inhibitors against *Leishmania donovani* calcium ion channel to fight Leishmaniasis. **Infectious Disorders Drug Targets**, v.17, n.2, p.120-129, 2017.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

LAURENTI, M. D. *et al.* Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary parasitology**, v. 196, n. 3-4, p.296-300, 2013.

LAURENTI, M. D. *et al.* Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 205, n. 3-4, p. 444-450, 2014.

LASKAY, T. V.; ZANDBERGEN, G., SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, 2003.

LASRI, S. *et al.* Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 91, n. 1, p. 13-18, 2003.

LEAL, G. G. A. *et al.* Immunological profile of resistance and susceptibility innaturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 472-482, 2014.

LEITE, N.C. *et al.* Perfil epidemiológico da Leishmaniose Visceral no Brasil no período de 2007 a 2017. **Revista de Patologia do Tocantins**, v.7. n.4, 2021.

LIMEIRA, C. H. *et al.* Molecular detection of *Leishmania infantum* in donkeys and mules under semiarid conditions in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. e015021, 2021.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 83, 2012.

LOMBARDI, P. *et al.* Clinical and Immunological Response in Dogs Naturally Infected by *L. infantum* Treated with a Nutritional Supplement. **Animals**, v. 9, n. 8, p. 501, 2019.

LUVIZOTTO, M.C.R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. COLÉGIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 1; 2006, Jaboticabal, São Paulo, Anais... Jaboticabal, 2006.

MACAU, W. L., *et al.* Main lesions in the central nervous system of dogs due to *Leishmania infantum* infection. **BMC veterinary research**, 2017, vol. 13, no 1, p. 1-4.

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

MANNA, L. *et al.* Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. **The veterinary journal**, v. 182, n. 3, p. 441-445, 2009.

MASTELLONE, V. *et al.* A Nutritional Supplement (DiLsh™) Improves the Inflammatory Cytokines Response, Oxidative Stress Markers and Clinical Signs in Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 938, 2020.

MATEO, M. *et al.* Comparative study on the short-term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniasis. **Parasitology research**, v. 105, p. 155-162, 2006.

MEDKOUR, H. *et al.* Potential of Artesunate in the treatment of visceral leishmaniasis in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: Efficacy evidence from a randomized field trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.14, n.12, p.e0008947, 2020.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Nota Técnica No 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/MapaNota Técnica**. [s.l: s.n.], 2016. Acesso em 05 de março de 2023.

MIRÓ, G. *et al.* Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trend in Parasitology**, v.24, p.371-377, 2008.

MOMO, C. *et al.* Morphological changes and parasite load of the adrenal from dogs with visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 30-35, 2014.

MORAIS-TEIXEIRA, *et al.* In vitro interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World Leishmania species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**; 69: 150-154, 2014.

MORALES-YUSTE M, MARTÍN-SÁNCHEZ J, CORPAS-LOPEZ V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 387, 2022.

MORENO J.; ALVAR J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitology**, v.18, p399–405, 2002.

NASCIMENTO, L. F.M *et al.* Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in *L. infantum* infected dogs. **Vaccine: X**, v. 4, p. 100048, 2020.

NOGUEIRA, F. S.; RIBEIRO, V. M. Leishmaniose Visceral. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P. KOGIKA, M. M.; **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. Rio de Janeiro: Roca, Cap. 80, p. 1270-1298, 2015.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 213-232, 2005.

NUNES, J.B. *et al.* Comparative analysis of real-time PCR assays in the detection of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 117, p. 3341-3346, 2018.

OIE. **Organização Mundial de Saúde Animal**. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris: DNDI, 2021. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_summry.htm. Acesso em: 21 jun. 2023.

OLÍAS-MOLERO, A. I. *et al.* Infection of dogs by *Leishmania infantum* elicits a general response of IgG subclasses. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 18826, 2020.

OLIVA, G. *et al.* Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1318-1322, 2006.

OLIVEIRA, T. M. F. *et al.* Study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 7-11, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) Regional strategic framework for accelerating and sustaining elimination of kala-azar in the South-East Asia Region: 2022–2026. In: **Regional strategic framework for accelerating and sustaining elimination of kala-azar in the South-East Asia Region: 2022–2026**, 2022.

PACIELLO, O. *et al.* Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania Infantum* infection. **Neuromuscular Disorders**, v. 19, n. 2, p. 124-130, 2009.

PALTRINIERI, S. *et al.* Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 552-578, 2016.

PALTRINIERI, S. *et al.* Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PEREIRA, M. *et al.* Canine neutrophils activate effector mechanisms in response to *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 248, p. 10-20, 2017.

PETERSEN, C. A., BARR, S. C. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1065-1074, 2009.

PLEVRAKI, K. *et al.* Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in Canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 2, p. 228-233, 2006.

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Cap. v. 12, p. 1-45, 2012.

PINEDA, C. *et al.* Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0185981, 2017.

PINILLA, J. C.; GUTIERREZ, A.; FLOREZ, A. A. Canine Visceral Leishmaniasis in Colombia Resistant to the Treatment of Choice (Meglumine Antimoniate Plus Allopurinol). **International Journal of Veterinary Science**, v.11, n. 1, p117-120. 2022.

PORTERO, Miriam, *et al.* Role of *Leishmania infantum* in Meningoencephalitis of Unknown Origin in Dogs from a Canine Leishmaniasis Endemic Area. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 571, 2021.

PROVERBIO D. *et al.* Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

REGINA-SILVA, S. *et al.* Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in

Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, p.462-468, 2014.

REGUERA, R. M. *et al.* Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 227, p. 98-114, 2016.

RIBEIRO, R. R., *et al.* Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Revista Clínica Veterinária**, v.71, p.66-76, 2007.

ROCHA, M. A. N. *et al.* Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 609-614, 2018.

RODRIGUES, B. C. *et al.* A retrospective cohort study of the effectiveness and adverse events of intralesional pentavalent antimonials in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, p. 257-263, 2020.

ROUGIER, S. *et al.* One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 245-253, 2012.

ROURA, X. *et al.* Canine Leishmaniosis Working Group. Canine leishmaniosis and kidney disease: Q&A for an overall management in clinical practice. **Journal of Small Animal Practice**, vol. 62, 2020.

SABATÉ, D. *et al.* Trial to Assess the Preventive Efficacy of a Domperidone-Based Treatment Programme against Clinical Canine Leishmaniasis in a High Prevalence Area. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 115, n. 1-2, p. 56-63, 2014.

SATRAGNO, D. *et al.* Autochthonous outbreak and expansion of canine visceral leishmaniasis, Uruguay. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 3, p. 536, 2017.

SAMPAIO, J. R. *et al.* *Leishmania infantum*-derived glycoinositolphospholipids in the immunodiagnosis of subclinically infected dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 581148, 2021.

SALANT, H. *et al.* Early onset of clinical leishmaniosis in a litter of pups with evidence of in utero transmission. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 326, 2021.

SEGARRA, S. Nutritional modulation of the immune response mediated by nucleotides in canine leishmaniosis. **Microorganisms**, v. 9, n.12, p. 2601, 2021.

SERENO, D. *et al.* Noninvasive biological samples to detect and diagnose infections due to trypanosomatidae parasites: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1684, 2020.

SHAW, J.J. Taxonomy of the Genus *Leishmania*: Present and Future Trends and Their Implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 471-478, Jul-Sep. 1994.

SILVEIRA, A. P. S. D. *et al.* PCR sensitivity of peripheral blood of dogs co-infected with *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp. in endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 843-847, 2018.

SHOKRI, A. *et al.* In vitro antileishmanial activity of novel azoles (3-imidazolylflavanones) against promastigote and amastigote stages of *Leishmania major*. **Acta tropica**, v. 167, p. 73-78, 2017.

SILVA, L. P. *et al.* Asymptomatic *Leishmania* infection in blood donors from a major blood bank in Northeastern Brazil: a cross-sectional study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, 2020.

SLIMANE, T. B. *et al.* An investigation on vertical transmission of *Leishmania infantum* in experimentally infected dogs and assessment of offspring's infectiousness potential by xenodiagnosis. **Veterinary parasitology**, v. 206, n. 3-4, p. 282-286, 2014.

SOARES, M. R. A. *et al.* Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva 1912 and *Cerdocyon thous* Linnaeus 1777, in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. **Acta tropica**, v. 174, p. 118-121, 2017.

SOLCÀ M.S. *et al.* Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2-4, p. 133-140, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasite & Vectors**, v. 4, p. 1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 706-717, 2017.

TREVISAN, *et al.* Diagnostic methods to cutaneous leishmaniasis detection in domestic dogs and cats. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 6, p. 868–872, 2015.

TOEPP, A. J. *et al.* Maternal *Leishmania infantum* infection status has significant impact on leishmaniasis in offspring. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007058, 2019.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. **Research in veterinary science**, v. 130, p. 19-25, 2020.

TORRES, M. *et al.* Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **The veterinary journal**, v. 188, n. 3, p. 346-351, 2011.

TORRES, M. *et al.* Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 6, p. 299-304, 2016.

VITALE, F. *et al.* TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, n. 1, p. 139-143, 2004.

VOULDOUKIS, I. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 137-146, 2006.

WANG, X.Y.; WANG, B.; WEN, Y.M. From therapeutic antibodies to immune complex vaccines. **NPJ/Vaccines**, v. 4, n. 1, p. 2, 2019.

YASUR-LANDAU, D. *et al.* Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from dogs with Disease Relapse. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004341, 2016.

YASUR-LANDAU, D. *et al.* Resistance of *Leishmania infantum* to allopurinol is associated with chromosome and gene copy number variations including decrease in the S-adenosylmethionine synthetase (METK) gene copy number. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 403-410, 2018.

ZANETTE, M. F. *et al.* Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 105-107, 2014.

ZEILHOFER, H. U.; SCHORR, W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. **Current opinion in hematology**, v. 7, n. 3, p. 178-182, 2000.

ZOBBA, R., *et al.* A case of canine neurological leishmaniasis. **Veterinaria Italiana**, v. 53, p. 321-326, 2017.

4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Avaliar o monitoramento terapêutico de cães com infecção natural por *Leishmania infantum*, tratados com marbofloxacina combinada ao alopurinol, sob o ponto de vista clínico, carga parasitária e perfil da produção de anticorpos.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar os escores físicos no monitoramento de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* tratados com marbofloxacina combinada ao alopurinol;

- Avaliar os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* no monitoramento de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* tratados com marbofloxacina combinada ao alopurinol;

- Avaliar a carga parasitária no monitoramento de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* tratados com marbofloxacina combinada ao alopurinol.

CAPÍTULO I

USO DA MARBOFLOXACINA COMBINADA COM ALOPURINOL SOB O PONTO DE VISTA CLÍNICO E PERFIL DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS NO MONITORAMENTO TERAPÊUTICO NA LEISHMANIOSE CANINA.

CAPÍTULO I

RESUMO

A leishmaniose canina é uma doença imunomediada com sinais clínicos bem variáveis e inespecíficos ao qual implica em um manejo terapêutico e monitoramento que precisa ser realizado com o auxílio de exames laboratoriais, dentre os vários exames requeridos tem-se a sorologia quantitativa. O objetivo deste estudo foi avaliar a combinação de marbofloxacina e alopurinol sob o ponto de vista clínico e perfil da produção de anticorpos anti-*Leishmania* no monitoramento terapêutico na Lcan. Foram utilizados 26 cães com diagnóstico parasitológico e divididos em dois grupos de tratamento: G1 - 15 animais tratados com marbofloxacina e alopurinol e G2 - 11 animais, apenas com miltefosina. Os cães foram monitorados durante 6 meses, com avaliações clínicas nos dias D0, D30, D90 e D180, sendo a sorologia quantitativa realizada apenas no início e final do tratamento. Os parâmetros clínicos foram classificados de acordo com a gravidade em uma escala de 0 a 3, conforme. Os animais do G1 e G2 apresentaram 86,6% e 45,4% respectivamente de redução nos escores clínicos nos primeiros três meses, respectivamente. A recidiva dos sinais clínicos foi observada em 9,1% do G2. Ao final do tratamento, a média da redução do escore clínico no G1 foi de 61,3% e 22,3% no G2. Ao final do tratamento, os títulos de anticorpos diminuíram em 93,3% com o uso da marbofloxacina e alopurinol, contra 63,6% utilizando apenas miltefosina. Observou-se em ambos os grupos que os cães com escores clínicos altos apresentaram títulos de anticorpos altos (D0) e conforme os escores clínicos diminuíram no D180, as titulações também reduziram com diferença significativa ($H = 19,2506$; $p = 0,0002$). A marbofloxacina com alopurinol mostrou-se viável e com ausência de efeitos adversos, embora por ser tratar de um antibacteriano com amplo espectro de ação, deve ser utilizado de forma racional. Novos estudos poderão demonstrar a redução da infectividade em cães tratados com marbofloxacina e alopurinol.

Palavras chave: Leishmaniose canina; tratamento; carga parasitária; fluorquinolona.

ABSTRACT

Canine leishmaniasis is an immunomediated disease with highly variable and nonspecific clinical signs, requiring therapeutic management and monitoring through laboratory tests, including quantitative serology. The objective of this study was to evaluate the combination of marbofloxacin and allopurinol from a clinical perspective and anti-*Leishmania* antibody production profile in therapeutic monitoring for CanL (Canine Leishmaniasis). Twenty-six dogs with parasitological diagnosis were divided into two treatment groups: G1 - 15 animals treated with marbofloxacin and allopurinol, and G2 - 11 animals treated with miltefosine only. The dogs were monitored for 6 months with clinical evaluations on days D0, D30, D90, and D180, and quantitative serology was performed only at the beginning and end of treatment. Clinical parameters were classified according to severity on a scale of 0 to 3. In the first three months, animals in G1 and G2 showed reductions of 86.6% and 45.4%, respectively, in clinical scores. Clinical signs relapsed in 9.1% of G2. At the end of treatment, the mean reduction in clinical scores was 61.3% for G1 and 22.3% for G2. Antibody titers decreased by 93.3% with the use of marbofloxacin and allopurinol, compared to 63.6% using miltefosine alone at the end of treatment. In both groups, dogs with high clinical scores had high antibody titers (D0), and as clinical scores decreased on D180, antibody titers also significantly reduced ($H = 19.2506$; $p = 0.0002$). Marbofloxacin with allopurinol proved to be viable and without adverse effects, although as it is an antibacterial with a broad spectrum of action, it must be used rationally. New studies may demonstrate a reduction in infectivity in dogs treated with marbofloxacin and allopurinol.

Keywords: Canine leishmaniasis; treatment; parasite load; fluoroquinolone.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é uma doença zoonótica causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida por flebotomíneos da subfamília Phlebotominae e tem o cão, como principal reservatório no ciclo epidemiológico urbano (ALVAR et al., 2004; ALCOVER et al., 2020; MATSUMOTO et al., 2022).

A leishmaniose canina (Lcan) está presente em aproximadamente 70 países, principalmente na América do Sul e região do Mediterrâneo (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; DANTAS-TORRES et al., 2012).

No Brasil, estudos demonstram que a prevalência da Lcan varia de 4,9% a 35,1%, dependendo da região avaliada e do método diagnóstico utilizado (MONTEIRO et al., 2005; ROCHA et al., 2018; CARVALHO et al., 2020; BERNARDINO et al., 2020; CARNEIRO et al., 2023). Sabe-se que as técnicas serológicas não têm a sensibilidade necessária para detectar anticorpos anti-*Leishmania* nas fases iniciais da infecção (MAIA, CAMPINO, 2008; COURA-VITAL et al., 2013).

A apresentação clínica da Lcan é variada, inespecífica e depende da resposta imune do hospedeiro (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Nos cães, a enfermidade apresenta-se geralmente de curso crônico e pode levar o animal ao óbito, mesmo quando tratada. Alguns animais infectados podem não desenvolver sinais clínicos ou alterações clínico-patológicas, tornando o diagnóstico da doença complexo (MIRÓ et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011), sendo muitas vezes necessária a combinação de testes sorológicos, parasitológicos e moleculares (MORALES-YUSTE, MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022; BANETH SOLANO-GALLEGO; 2022).

No território brasileiro, o uso de drogas anti-*Leishmania* em cães tem sido um desafio para os médicos-veterinários por se tratar de um tratamento contínuo, caro e com opções de tratamento limitadas, visto que a única droga leishmanicida licenciada é a miltefosina (REGUERA et al., 2016; MAPA, 2016). Devido à inexistência da cura parasitológica, é necessário o acompanhamento da carga parasitária que pode ser reduzida a longo prazo a depender da resposta terapêutica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022).

Dentre os vários exames requeridos para o correto monitoramento da Lcan, há a sorologia quantitativa pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a PCR

em tempo real (qPCR) (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Embora existam estudos que demonstrem uma relação direta entre clínica e os títulos de anticorpos na Lcan (PROVERBIO et al., 2014), outros observaram sinais clínicos presentes e títulos de anticorpos baixos a médios (PALTRINIERI et al, 2016).

A qPCR auxilia na quantificação de cargas parasitárias de *L. infantum* em vários tecidos biológicos e possui uma sensibilidade e especificidade altas (VITALE et al., 2004; FRANCINO et al., 2006; NUNES et al., 2018; CANTOS- BARREDA et al., 2020).

As frequentes recidivas da doença após a terapia, sugerem a busca por novos medicamentos ou abordagens terapêuticas para Lcan. Por essas razões, terapias alternativas como marbofloxacina também foram descritas no tratamento da Lcan (ROUGIER et al., 2012; PINEDA et al., 2017). Esse fármaco tem ação leishmanicida em macrófagos infectados in vitro, além de propriedades imunomoduladoras (DALHOFF, SHALIT, 2003; VOULDOUKIS et al., 2006; AMANTE et al, 2020).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o monitoramento terapêutico de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* tratados com marbofloxacina combinada com alopurinol, sob o ponto de vista clínico e perfil da produção de anticorpos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Conselho de ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) registrado sob o protocolo de número 8764010520 (Anexo 2). Os tutores dos cães foram informados dos procedimentos de inclusão para o tratamento experimental por meio da assinatura de um termo de consentimento da pesquisa (Apêndice 1).

2.2 Critérios de exclusão e inclusão

Foram pré-selecionados 52 cães domiciliados, de ambos os sexos, de raça variadas e idade entre um a sete anos, atendidos no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário (Hovet) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Todos

os cães apresentavam ao menos um sinal clínico sugestivo de LV e positivos no diagnóstico parasitológico realizado a partir do aspirado de medula óssea, linfonodos ou citologia aspirativa da pele.

Dos cães pré-selecionados, 26 foram retirados da pesquisa de acordo com os critérios de exclusão: doença renal crônica, reagentes no SNAP® 4Dx® Plus (IDEXX®) e/ou presença de hemoparasito (*Babesia* sp, *Anaplasma* sp, *Hepatozoon* sp, *Ehrlichia* sp e microfilarias) em esfregaço sanguíneo, administração de miltefosina, alopurinol, fluorquinolonas ou qualquer outro fármaco com ação contra *Leishmania* spp (12 meses anteriores à pesquisa). Os cães que foram a óbito ou não retornaram nas avaliações também foram excluídos.

2.4 Desenho experimental

Este estudo é um ensaio clínico randomizado, no qual os cães foram divididos aleatoriamente em dois grupos de tratamento: Grupo 1 (G1) - 15 animais tratados com marbofloxacina (Marbopet® Laboratório CEVA, Brasil) na dose de 2mg/kg/dia, por via oral, durante 28 dias em combinação com alopurinol (manipulação veterinária) na dose de 10mg/kg BID, por via oral durante 180 dias e Grupo 2/controle (G2) - 11 animais submetidos à miltefosina (Milteforan® Laboratório VIRBAC, Brasil) na dose de 2mg/kg/dia, via oral durante 28 dias.

Os animais, de ambos os grupos, foram monitorados clinicamente durante 6 meses, com avaliações clínicas nos dias zero (D0), que é o início do tratamento, 30 dias (D30), 90 dias (D90) e 180 dias (D180) após o tratamento. O perfil de anticorpos foi realizado no início e término do experimento.

Nas terapias de apoio, foram utilizadas apenas anti-inflamatórios (corticosteróides, AINEs) de uso local e colírios oftalmológicos para o manejo das lesões oftálmicas causadas pela infecção por *L. infantum*. Coleiras repelentes aos flebotomíneos foram utilizadas nos animais para evitar a reinfecção dos pacientes e como forma de controle e prevenção da doença.



Figura 1. Desenho experimental.
Fonte: Nascimento (2023)

2.5 Avaliação clínica

Durante o monitoramento, todos os animais foram avaliados quanto à presença de sinais físicos como dermatopatias, linfadenopatias, sinais oftálmicos, sinais gastrintestinais, distúrbios miccionais, epistaxe e alterações músculo-esqueléticas. Em todos os momentos eram verificados os pesos dos animais. Pelo menos dois avaliadores estavam aptos para fazer a avaliação física nos cães.

Os parâmetros clínicos foram classificados de acordo com a gravidade em uma escala de 0 a 3, conforme segue: 0: ausente; 1: leve; 2: moderado; e 3: grave. Além disso, linfadenomegalia ou lesões cutâneas foram classificadas da seguinte forma: 0 (ausente), 1 (local) e 2 (generalizado) adaptado de Rougier, et al., (2012). Ao final das análises, os escores físicos dos cães foram inseridos na ficha de avaliação (Apêndice 2).

2.6 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A amostra de *L. infantum* foi mantida através de repiques semanais de culturas de promastigotas em meio bifásico (NNN/Schenider). A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (1966) em que foram utilizadas microplacas para a diluição dos soros, pipetando-se 90 µL de PBS 0,01M, pH 7,2 e 10 µL do soro a ser testado no primeiro orifício.

Foram distribuídos 50 µL de PBS 0,01M, pH 7,2 em outros cinco poços a partir da primeira diluição, transferindo-se 50 µL para o orifício seguinte. Os controles

positivo e negativo foram obtidos a partir da soroteca do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFRPE.

2.7 Análise dos dados

As variáveis foram analisadas por meio de estatística descritiva. Posteriormente, o teste de Lilliefors para verificar a normalidade dos dados e o teste de qui-quadrado para comparar os diferentes tratamentos em relação aos títulos de anticorpos.

O Teste de Wilcoxon, foi utilizado para analisar as respostas aos fármacos em relação aos títulos de anticorpos ao longo dos diferentes tratamentos. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. O software BioEstat versão 5.3 foi usado para as análises estatísticas (AYRES et al., 2007).

A redução dos escores clínicos foi calculada de acordo com MEDKOUR et al., 2020: *Redução percentual de EC% = (EC no D+xx- ES no D+0) / EC no D0) x 100*. EC: escore clínico; D+xx: no Dia xx pós-tratamento (D30, D90 ou D180), D0: na inclusão (dia 0).

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação clínica

No início de tratamento (D0), 73,3% (11/15) apresentavam dermatopatias no G1, enquanto no G2 essa frequência foi 63,6% (7/11). As linfadenomegalias foram observadas em 72,7% (8/11) no G2, e 93,4% (14/15) no G1. Outros sinais estavam presentes como os problemas articulares: 13,3% (G1) e 18,62% (G2), e oftalmopatias, 20,0% (G1) e 27,3% (G2). Ao final do tratamento, apenas um animal do G2 apresentou dermatite ulcerativa. No G1, observou-se lesão ulcerativa localizada em dois cães (Figura 1).

Os animais do G1 e G2 apresentaram 86,6% e 45,4% respectivamente de redução nos escores clínicos nos primeiros três meses. A recidiva dos sinais clínicos foi observada em 9,1% do G2. Ao final do tratamento, a média da redução do escore clínico no G1 foi de 61,3% e 22,3% no G2.



Figura 2. Redução dos sinais clínicos ao longo do tratamento dos cães.

3.2 Títulos de anticorpos anti-*Leishmania*

Os títulos de anticorpos diminuíram em 93,3% com o uso da marbofloxacina e alopurinol, contra 63,6% utilizando apenas miltefosina (grupo controle) do final do tratamento (D180) (Figura 3). Porém, não houve diferença estatística ($X^2 = 0,016$; $p = 0,8982$). Um dos animais do G2 apresentou dermatite ulcerativa em região nasal (D0), mas com altos títulos de anticorpos: 1/320. No presente estudo, observou-se que 15,4% dos cães do G1 (D0) apresentaram altos títulos de anticorpos e com presença apenas um sinal clínico, a linfadenomegalia.

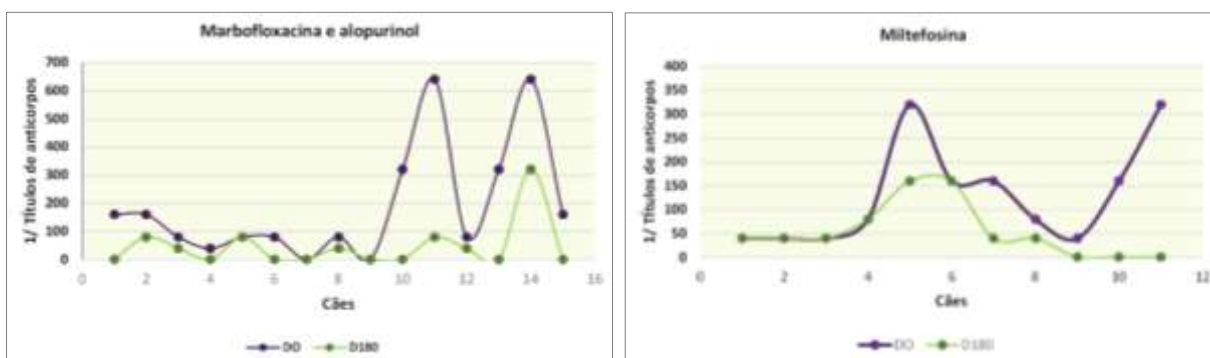


Figura 3. Números absolutos de títulos de anticorpos momentos D0 e D180 de cães no G1 e G2.

O grupo tratado com marbofloxacina associada ao alopurinol apresentou mais do que 50% de títulos negativados após seis meses de tratamento, enquanto no grupo da miltefosina (G2) negativou-se em 27,3%. Porém, não houve diferença estatística ($X^2 = 0,016$; $p = 0,8982$).

Observou-se em ambos os grupos, que os cães com escores clínicos altos apresentaram títulos de anticorpos altos (D0) e conforme os escores clínicos diminuíram no D180, as titulações também reduziram com diferença significativa ($H = 19,2506$; $p = 0,0002$).

Animais	Pontuação dos Escores clínicos						Títulos de anticorpos			
	Marbofloxacina + alopurinol (G1)			Miltefosina (G2)			Marbofloxacina + alopurinol (G1)		Miltefosina (G2)	
	D0	D180	% REC	D0	D180	% REC	D0	D180	D0	D180
1	3	1	66,6	6	1	83,3	1/160	0	1/40	1/40
2	1	1	0	3	3	100	1/160	1/80	1/40	1/40
3	10	2	80	1	5	0	1/80	1/40	1/40	1/40
4	6	3	50	6	2	66,6	1/40	0	1/80	1/80
5	9	2	77	10	2	80	1/80	1/80	1/320	1/160
6	1	0	100	19	6	68,4	1/80	0	1/160	1/160
7	1	0	100	3	1	66,6	0	0	1/160	1/40
8	11	0	100	9	4	55,6	1/80	1/40	1/80	1/40
9	1	1	0	4	1	75	0	0	1/40	0
10	1	1	0	4	2	50	1/320	0	1/160	0
11	11	1	90,9	1	0	100	1/640	1/80	1/320	0
12	8	1	87,5	-	-	-	1/80	1/40	-	-
13	2	1	50	-	-	-	1/320	0	-	-
14	2	1	50	-	-	-	1/640	1/320	-	-
15	3	1	66,6	-	-	-	1/160	0	-	-

Figura 4. Pontuação de escores clínicos e títulos de anticorpos nos momentos D0 e D180 de cães submetidos ao tratamento no grupo 1 (G1) e 2 (G2). REC: redução do escore clínico.

4. DISCUSSÃO

No estudo, não houve nenhum efeito adverso ao uso dos protocolos. Outros dados de pesquisa também obtiveram resultados semelhantes (MIRÓ et al., 2009, ROUGIER et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2019).

A eficácia clínica da marbofloxacina e alopurinol durante os três meses da pesquisa foi maior (73,3%) quando comparada com o protocolo de marbofloxacina (68,9%) de Rougier et al. (2012). Essa eficácia (G1) foi mantida com leve aumento até o final do tratamento (86,6%). Isso provavelmente se deve à ação leishmanioestática do alopurinol ao qual mantém o animal clinicamente estável. Enquanto na monoterapia, Rougier et al. (2012) observaram recidiva média de cinco meses e meio

após o término do tratamento com marbofloxacina. Esse achado foi fundamental para determinar a eficácia da combinação desse fármaco com o alopurinol no presente estudo.

No grupo controle (G2), os escores clínicos diminuíram, entretanto é nítido que a redução foi bem maior na terapia combinada do G1. Assim, além da ação combinada do alopurinol, essa maior redução pode ser explicada pelos efeitos imunomodulares das fluorquinolonas (DALHOFF, SHALIT, 2003; VOULDOUKIS et al., 2006). A miltefosina (G2) foi utilizada como monoterapia porque tem ação leishmanicida, sendo o único tratamento licenciado no Brasil (MAPA, 2016) e possui uma ação de mais quatro a oito semanas após seu término do protocolo (WOERLY et al., 2009; DOS SANTOS NOGUEIRA et al., 2019).

Ainda, não se pode negar que a miltefosina é capaz de estimular células T elevando os níveis de IFN- γ , estimulando assim a produção de óxido nítrico e radicais reativos de oxigênio, eliminando os parasitos (MANNA et al., 2009; DORLO et al., 2012; REGUERA et al., 2016). Entretanto, apesar dos estudos acima, os resultados dos escores clínicos do G2 não corroboram com estas pesquisas (WORLEY et al., 2009; ANDRADE et al., 2011; DOS SANTOS NOGUEIRA et al., 2019). No presente estudo, resultou-se uma média de 45,4% de redução contra 68,26% no dia 90 descrito por dos Santos Nogueira et al. (2019).

A recidiva somente foi observada no grupo G2, com uma média de 60 dias após o início do tratamento, e foi acompanhada de um declínio na carga parasitária, apesar disso, foi observado que a combinação desse fármaco com alopurinol também resultou em recidiva (14,3% dos cães) antes dos 6 meses de tratamento (MANNA et al., 2009).

Com a relação aos títulos de anticorpos, o G1 apresentou mais do que 50% de resultados não reagentes após seis meses de tratamento, enquanto no grupo da miltefosina (G2), 27,3% foram não reagentes após o início do tratamento.

É sabido que o aparecimento dos sinais clínicos característicos da Lcan é resultado principalmente da resposta imune do hospedeiro, que envolve a deposição de imunocomplexos solúveis em vários tecidos (QUINNELL et al., 2003). Alguns estudos relatam que cães com sinais clínicos evidentes exibem altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* associados à redução da resposta imune celular (BANETH et al., 2008; GIZZARELLI et al., 2021). Os dados ora obtidos também corroboraram

os estudos mencionados, entretanto observa-se que houve cães (G1: 5; G: 2) em ambos os grupos com títulos altos (D0) e poucos sinais clínicos evidentes. Ao longo do tratamento com miltefosina, quase 50% dos animais não apresentaram diminuição das titulações de anticorpos, apenas mantiveram o mesmo valor do início de tratamento.

Outros estudos reforçam essa ideia de que o aumento das imunoglobulinas não está associado a sinais clínicos (FREITAS et al., 2012), o que indica a importância de realizar o acompanhamento de cães com LV com titulação de anticorpos, além da avaliação da carga parasitária, porque estudos demonstraram que pode levar até três anos para que os anticorpos sejam detectados após a infecção (SOLANO-GALLEGO et al., 2007) e alguns cães permanecem negativos para anticorpos indefinidamente (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; LEONTIDES et al., 2002). Apesar do estudo ter demonstrado uma correlação entre os escores clínicos e os títulos de anticorpos, quando utilizada isoladamente não constitui uma boa ferramenta para o monitoramento terapêutico em cães infectados por *L. infantum*.

O acompanhamento durante seis meses de cães tratados com marbofloxacina e alopurinol permitiu observar uma melhora clínica significativa, com cura clínica em 3 animais (3/15). Na tentativa de uma melhor resposta terapêutica, a proposta inédita da combinação de marbofloxacina e alopurinol, demonstrou um potencial protocolo para o uso em cães com Lcan, principalmente no Brasil, pois só existe uma medicação licenciada para tal, com efeitos gastrintestinais presentes.

A marbofloxacina com alopurinol mostrou-se viável e com ausência de efeitos adversos, embora por ser tratar de um antibacteriano com amplo espectro de ação, deve ser utilizado de forma racional. Novos estudos poderão demonstrar a redução da infectividade em cães tratados com marbofloxacina e alopurinol.

5 REFERENCIAS

ALCOVER, M. M., et al. Wild mammals as potential silent reservoirs of *Leishmania infantum* in a Mediterranean area. **Preventive veterinary medicine**, v. 175, p. 104874, 2020.

ALVAR, J. et al. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 2004.57: 2-88

AMANTE, J. F. D. A. A., *et al.* Langoni, H. Marbofloxacin induces leishmanicidal activity and less inflammatory response in *Leishmania chagasi* infected macrophages. **Veterinária e Zootecnia**, v.27, p.1-11, 2020.

AYRES, E. D. C. B. S. *et al.* Clinical and parasitological impact of short-term treatment using miltefosine and allopurinol monotherapy or combination therapy in canine visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, 2022.

BANETH G, SOLANO-GALLEGO L. Leishmaniasis. **Veterinary Clinic Small Animals**, v. 52, p. 1359–1375, 2022.

BASTOS, D. S.S *et al.* Could combination chemotherapy be more effective than monotherapy in the treatment of visceral leishmaniasis? A systematic review of preclinical evidence. **Parasitology**, v. 149, n. 6, p. 751-764, 2022.

BERNARDINO, M. G. S. *et al.* High seroprevalence and associated factors for visceral leishmaniasis in dogs in a transmission area of Paraíba state, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 2020.

BRASILEISH - Grupo de Estudo em Leishmaniose Animal. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina. Ed. Agitta, Três Lagoas – MS, 2018.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis. Technical modification employing culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 8, n. 5, p. 227-234, 1966.

CANTOS-BARREDA, A., *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in saliva of dogs. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 73, 101542, 2020.

CARNEIRO, Liliane A. *et al.* Prevalence and incidence of canine visceral leishmaniasis and its clinical–immunological features in an endemic area of the Brazilian Amazon. **Veterinary Medicine and Science**, 2023.

CARVALHO, M. R. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: perception, prevalence, and spatial distribution in municipality of Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 2020.

COURA-VITAL W, *et al.* Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.8, 2011.

COURA-VITAL, W. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 411-417, 2013.

DALHOFF A, SHALIT I. Immunomodulatory effects of quinolones. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 6, p. 359-371, 2003.

DANTAS-TORRES F., *et al.* Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends Parasitology**, Dec;28(12):531-8, 2012.

DIAS, Á. F. D. L. R. *et al.* Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 217, 2020.

DORLO, T.P.C. *et al.* Miltefosine: A Review of Its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DOS SANTOS NOGUEIRA, F. *et al.* Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2019.

FRANCINO, O., *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, 137(3-4), 214-221, 2006.

FREITAS, J. C. C *et al.* Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 24-29, 2012.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K. **Manual de Urinálise Veterinária**, 2.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 95p.

GIZZARELLI, M. *et al.* Examining the Relationship of Clinical and Laboratory Parameters with Infectious ness to *Phlebotomus perniciosus* and Its Potential Infectivity in Dogs With Overt Clinical Leishmaniasis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 667290, 2021.

JESUS, L. *et al.* Xanthinuria secondary to allopurinol treatment in dogs with leishmaniosis: Current perspectives of the Iberian veterinary community. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 83, p. 101783, 2022.

LEONTIDES L.S. *et al.* A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p.19-27, 2002.

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

MANNA, L. *et al.* Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **The veterinary journal**, v. 182, n. 3, p. 441-445, 2009.

- MARCELINO, A. P. et al. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Acta tropica**, v. 207, p. 105495, 2020.
- MATSUMOTO, P. S. S., et al. The path of canine visceral leishmaniasis versus the path of Center for Zoonoses Control: contributions of spatial analysis to health. **Cadernos de Saúde Pública**, v.38, n.1, e00272020, 2022.
- MEDKOUR H. O. et al. Potential of Artesunate in the treatment of visceral leishmaniasis in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: Efficacy evidence from a randomized field trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 18, n. 14(12): e0008947, 2020.
- MINISTÉRIO DE AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Nota Técnica No 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/MapaNota Técnica**. [s.l: s.n.], 2016. Acesso em 05 de março de 2023.
- MIRÓ, G., et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trend in Parasitology**, v.24, p.371-377, 2008.
- MIRÓ, G. et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. **Veterinary dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 397-404, 2009.
- MONTEIRO, É. M., et al. Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, 2005.
- MORALES-YUSTE M, MARTÍN-SÁNCHEZ J, CORPAS-LOPEZ V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 387, 2022.
- NUNES JB, et al. Comparative analysis of real-time PCR assays in the detection of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. ;117(10):3341-3346, 2018.
- PROVERBIO D. et al. Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- QUINNELL, R. J. et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, v. 55, p. 23-28, 2003.
- PINEDA, C., et al. Tratamento da leishmaniose canina com marbofloxacina em cães com doença renal. **Public Library of Science (PLoS)**, 12 (10), 2017.
- REGUERA, R. M. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 227, p. 98-114, 2016.

ROCHA, M. A. N., *et al.* Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. ***Brazilian Journal of Biology***, 78, 609-614, 2018.

ROUGIER, S. *et al.* One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. ***Veterinary parasitology***, v. 186, n. 3-4, p. 245-253, 2012.

SOLANO-GALLEGO L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. ***Journal of Clinical Microbiology***, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. ***Veterinary Parasitology***, v.165, p.1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. ***Parasite & Vectors***, v.4, p.1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; *et al.* Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. ***Trends in Parasitology***, v.33. n.9, p.706-717, 2017.

TORRES, M. *et al.* Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. ***The veterinary journal***, v. 188, n. 3, p. 346-351, 2011.

TORRES, M. *et al.* Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. ***Journal of Small Animal Practice***, v. 57, n. 6, p. 299-304, 2016.

VITALE, F., *et al.* 2004. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. ***Annals of the New York Academy of Sciences***, 1026, 139–143, 2004.

VOULDOUKIS I, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. ***Veterinary Parasitology***, Jan 30;135(2):137-46, 2006.

WOERLY, V., *et al.* Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. ***Parasitology research***, 105, 463-469, 2009.

CAPÍTULO II

**AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA NO MONITORAMENTO DE CÃES
COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania infantum* TRATADOS COM
MARBOFLOXACINA COMBINADA AO ALOPURINOL.**

CAPÍTULO II

Resumo

A leishmaniose visceral é uma doença parasitária zoonótica que acomete os animais e humanos. No Brasil, o cão é o principal hospedeiro em ambientes urbanos, com sinais clínicos variáveis e inespecíficos, assim tem-se um tratamento desafiante para o veterinário por ser uma afecção imunomediada. Ao longo do tratamento da leishmaniose canina (Lcan), a carga parasitária pode ser reduzida desde que ocorra um monitoramento a longo prazo para acompanhar a resposta terapêutica e detectar possíveis recaídas. Nesse sentido, a qPCR facilita a quantificação da carga parasitaria em determinado tecido ou amostra biológica. O objetivo deste estudo foi avaliar a carga parasitária em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Foram utilizados 26 cães acometidos por leishmaniose e divididos em dois grupos de tratamento: Grupo 1 (G1: 15 animais) tratados com marbofloxacina e alopurinol e Grupo 2 (G2: 11 animais) com miltefosina. A qPCR foi baseada na amplificação de *L.infantum* do minicirculo do cinetoplasto (kDNA) e foi empregado o conjunto LINF 1B, conforme protocolo padronizado por De Paiva Cavalcanti et al. (2009). Antes do início do tratamento, a média do número de parasitos/ μ L na medula óssea foi, para o G1, de 239.267 com uma mediana de 13.792 parasitos/ μ L. No G2, a média foi de 965.795,1 parasitos/ μ L com mediana de 117,8 parasitos/ μ L. Uma redução significativa na carga parasitária na medula óssea foi observada após 180 dias do tratamento (D180) ($P < 0,0001$), principalmente no G1 (53,3%) comparando com o G2 (36,4%), exceto por dois animais em cada grupo em que não foi detectado DNA do parasito. A marbofloxacina com alopurinol mostrou-se viável para a redução da carga parasitária, porém novos estudos poderão demonstrar a redução da infectividade em cães.

Palavras chave: Leishmaniose canina; tratamento; carga parasitária; fluorquinolona.

Abstract

Visceral leishmaniasis is a zoonotic parasitic disease that affects both animals and humans. In Brazil, dogs are the primary hosts in urban environments, exhibiting variable and nonspecific clinical signs, making it a challenging condition for veterinarians due to its immunomediated nature. During the treatment of canine leishmaniasis (CanL), the parasite load can be reduced if long-term monitoring is performed to track the therapeutic response and detect possible relapses. In this regard, qPCR (quantitative polymerase chain reaction) facilitates the quantification of the parasite load in specific tissues or biological samples. The objective of this study was to evaluate the parasite load in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. Twenty-six dogs affected by leishmaniasis were divided into two treatment groups: Group 1 (G1: 15 animals) treated with marbofloxacin and allopurinol, and Group 2 (G2: 11 animals) treated with miltefosine. The qPCR was based on the amplification of *L. infantum* kDNA (kinetoplast minicircle) and employed the primer set LINF 1B, following the protocol standardized by De Paiva Cavalcanti et al. (2009). Prior to the start of treatment, the mean number of parasites/ μL in the bone marrow was, for G1, 239,267 with a median of 13,792 parasites/ μL . In G2, the mean was 965,795.1 parasites/ μL with a median of 117.8 parasites/ μL . A significant reduction in parasite load in the bone marrow was observed after 180 days of treatment (D180) ($P < 0.0001$), particularly in G1 (53.3%) compared to G2 (36.4%), except for two animals in each group where no parasite DNA was detected. Marbofloxacin with allopurinol proved to be viable for reducing parasite load, but new studies may demonstrate a reduction in infectivity in dogs.

Keywords: Canine leishmaniasis; treatment; parasite load; fluoroquinolone.

1.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é uma doença zoonótica causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida por flebotomíneos da subfamília Phlebotominae e tendo o cão como principal reservatório no ciclo epidemiológico urbano (ALVAR et al., 2004; ALCOVER et al., 2020; MATSUMOTO et al., 2022).

A leishmaniose canina (Lcan) está presente em aproximadamente 70 países, principalmente na América do Sul e região do Mediterrâneo (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; DANTAS-TORRES et al., 2012). No Brasil, estudos de prevalência da Lcan observaram variações de 4% a 75%, dependendo da região avaliada e do método diagnóstico utilizado (COURA-VITAL et al., 2011; ROCHA et al., 2018).

A apresentação clínica da Lcan é variada e bastante inespecífica e depende da resposta imune do hospedeiro (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Nesses animais, a enfermidade apresenta-se geralmente de curso crônico e pode levar o animal ao óbito, mesmo quando tratada. Alguns cães infectados podem não desenvolver sinais clínicos ou alterações clínico-patológicas, tornando o diagnóstico da doença complexo nesses animais (MIRÓ et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

O uso de drogas anti-*Leishmania* em cães tem sido um desafio para os médicos veterinários por se tratar de um tratamento contínuo, caro e com opções de tratamento limitadas, visto que a única droga licenciada no Brasil é a miltefosina (REGUERA et al., 2016; MAPA, 2016).

As frequentes recidivas da doença após a terapia atualmente disponível sugere a busca por novos medicamentos ou abordagens terapêuticas para Lcan. Por essas razões, terapias alternativas como marbofloxacina também têm sido—descritas (ROUGIER et al., 2012).

Devido à inexistência da cura parasitológica, a carga parasitária pode ser reduzida desde que ocorra um monitoramento a longo prazo para acompanhar a resposta terapêutica e detectar possíveis recaídas (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022).

Esse acompanhamento requer exames moleculares como a PCR em tempo real (qPCR), que permite quantificar a amplificação do produto da reação com sensibilidade de cerca de 93% e uma especificidade de 100% (HOSSAIN et al. 2017). Estudos confirmaram o potencial da qPCR na quantificação de cargas

parasitárias de *L. infantum* em vários tecidos (VITALE et al., 2004; FRANCINO et al., 2006; NUNES et al., 2018; CANTOS- BARREDA et al., 2020).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a carga parasitária no monitoramento de cães com infecção natural por *L. infantum* tratados com marbofloxacina combinada ao alopurinol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Conselho de ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) registrado sob o protocolo de número 8764010520 (Anexo 2).

2.2 Animais e critérios de exclusão e inclusão

Foram pré-selecionados 52 cães domiciliados, de ambos os sexos, de raça variadas e idade entre um a sete anos, atendidos no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário (Hovet) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Todos os cães apresentavam ao menos um sinal clínico sugestivo de LV e positivos no diagnóstico parasitológico realizado a partir do aspirado de medula óssea, linfonodos ou citologia aspirativa da pele.

Dos cães pré-selecionados, 26 foram retirados da pesquisa de acordo com os critérios de exclusão: doença renal crônica, reagentes no SNAP® 4Dx® Plus (IDEXX®) e/ou presença de hemoparasito (*Babesia* sp, *Anaplasma* sp, *Hepatozoon* sp, *Ehrlichia* sp e microfilarias) em esfregaço sanguíneo, administração de miltefosina, alopurinol, fluorquinolonas ou qualquer outro fármaco com ação contra *Leishmania* spp (12 meses anteriores à pesquisa). Os cães que foram a óbito ou não retornaram nas avaliações também foram excluídos.

2.3 Protocolo experimental

Os animais foram divididos em dois grupos de tratamento: 15 cães no Grupo 1 (G1) tratados com marbofloxacina (Marbopet® Laboratório CEVA, Brasil) na dose de 2mg/kg/dia, via oral, durante 28 dias em combinação com alopurinol (manipulação veterinária) na dose de 10mg/kg BID, oral, durante 180 dias e 11 cães no Grupo 2 (G2) com miltefosina (Milteforan® Laboratório VIRBAC, Brasil) na dose de 2mg/kg/dia via oral durante 28 dias. A miltefosina foi utilizada apenas como controle da pesquisa, por ser um tratamento clássico e único autorizado no Brasil.

Os animais, de ambos os grupos, foram monitorados clinicamente nos dias zero, que é o início do tratamento (D0), 30 dias (D30), 90 dias (D90) e 180 (D180) dias após o tratamento. A carga parasitária da medula óssea foi realizada no início e término do experimento. Permitiu-se o uso de anti-inflamatórios (corticosteróides, AINEs) de uso local e colírios oftalmológicos para o manejo das lesões oftálmicas. Coleiras repelentes aos flebotomíneos foram utilizadas nos animais para evitar a reinfecção dos pacientes e como forma de controle e prevenção a transmissão dos flebotomíneos.

2.4 Coletas de medula óssea

A punção aspirativa medular foi realizada na região do osso esterno e/ou crista ilíaca, com o auxílio de uma agulha hipodérmica 40x12 (18G) acoplada a uma seringa de 20ml (contendo 10 microlitros de ácido etilenodiaminotetraacético – EDTA). O material aspirado foi acondicionado em microtubos de polipropileno atóxico em uma temperatura de - 80°C até a extração do DNA da amostra. Um esfregaço de medula óssea foi realizado para a busca de formas amastigotas de *Leishmania* e confirmação de uma amostra de boa qualidade (com alta celularidade medular).

Para a contenção do animal, foi utilizado a forma mecânica ou a química, ao qual o cão era avaliado pela equipe de anestesia do Hovet – UFRPE e realizado o procedimento anestésico e pós-anestésico.

2.5 Carga parasitária - qPCR

A extração de DNA e a qPCR foi realizada no Laboratório de Imunoparasitologia e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ. A extração de medula óssea foi realizada usando o QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN® Sample and Assay Technologies, Germantown, MD, EUA), de acordo com o fabricante instruções. O DNA foi armazenado em tubos de microtubos (1,5 mL) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até os ensaios moleculares.

A qPCR foi baseada na amplificação de *L. infantum* do minicirculo do cinetoplasto (kDNA) e foi empregado o conjunto LINF 1B, conforme protocolo padronizado por De Paiva Cavalcanti et al. (2009). Uma série de diluições de DNA padrão de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) (0,01 fg–1000 ng) foi usado para avaliar o limite de detecção do sistema: 0,07 parasitos por reação ou 10fg de DNA.

Esse método foi realizado em dois aparelhos de PCR em tempo real: ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, CA, USA) e QuantStud. A qPCR foi realizada em ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, CA, USA) e QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) utilizando uma reação de 50 μL : 2 μL de DNA, 3 pmol de cada primer 5'-CCAGAACATCATCCCTGCTT-3', e 5'-ACCACCTGGTCCTCAGTGT-3' (SOLANO-GALLEGO et al., 2007) e 25 μL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial 95oC/10 mim, seguida por 40 ciclos de 95oC/15 s, 60oC/50 s e 72oC/30 s.

2.6 Análise dos dados

As variáveis foram analisadas por meio de estatística descritiva. Posteriormente, o teste de Lilliefors para verificar a normalidade dos dados e o teste de qui-quadrado para comparar os diferentes tratamentos em relação a diminuição da carga parasitária.

O Teste de Wilcoxon, foi utilizado para analisar as respostas aos fármacos em relação as cargas parasitárias ao longo dos diferentes tratamentos. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. O software BioEstat versão 5.3 foi usado para as análises estatísticas (AYRES et al., 2007).

3. RESULTADOS

3.1 Carga parasitária

No grupo 1 (D0), a média do número de parasitos/ μL na medula óssea foi de 239.267 com uma mediana de 13.792 parasitos/ μL . No grupo da miltefosina, a média foi de 965.795,1 parasitos/ μL com mediana de 117,8 parasitos/ μL (Figura 01).

Uma redução significativa na carga parasitária na medula óssea foi observada após o tratamento (D180) ($P < 0,0001$), principalmente no G1 (53,3%) comparando com o G2 (36,4%), exceto por dois animais em cada grupo que foram negativados.

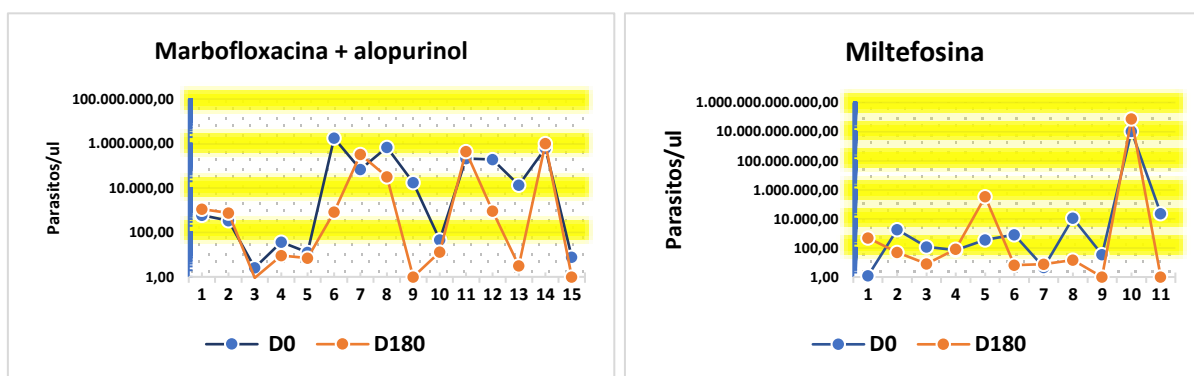


Figura 01 - Números absolutos de *Leishmania*/ μL * em amostras de medula óssea nos momentos D0 e D180 de cães no G1 e G2.

*Valores negativos foram inseridos como 1 parasito/ μL devido à escala logarítmica.

4. DISCUSSÃO

O tratamento da Lcan é um grande desafio para o clínico veterinário, pois não há muitos fármacos disponíveis e alguns apresentam efeitos adversos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BANETH, SOLANO-GALLEGO; 2022). Além disso, como não existe cura parasitológica, é necessário monitorar o animal ao longo da vida por diversos exames laboratoriais (BANETH SOLANO-GALLEGO; 2022).

Neste sentido, exames de monitoramento como a qPCR facilita a quantificação da carga parasitária em determinado tecido ou amostra biológica (GALLUZZI et al., 2018; DANTAS-TORRES et al., 2019).

No estudo demonstrou-se que o uso da marbofloxacina e alopurinol reduziu carga parasitária (média de 85,6%), apesar da carga parasitária ter aumentado em cinco animais (5/15) com seis meses de tratamento. No grupo controle, a média de redução foi maior (97%), porém 30% dos cães tiveram aumento na carga parasitária aos 6 meses de tratamento. Sabe-se que a combinação de medicamentos na leishmaniose, aumenta o sinergismo, toxicidade parasitária direta e melhores respostas imunológicas em hospedeiros infectados (BASTOS et al., 2022).

Ao considerar a evolução das cargas parasitárias nos diferentes tratamentos, no G1, cerca de 13,3% dos cães negativaram na medula óssea (ausência de DNA do parasito), isso, é um ponto bastante positivo, pois o grupo de tratamento clássico (miltefosina) negativou em apenas 18,2%. Além disso, os tratamentos anti-*Leishmania* são classicamente conhecidos por não eliminar todos os parasitos dos tecidos (MIRÓ et al., 2009, ROUGIER et al., 2012; DOS SANTOS NOGUEIRA et al., 2019; AYRES, et al. 2022).

Em pesquisas realizadas anteriormente, demonstrou-se que o uso da marbofloxacina em cães naturalmente infectados por *L. infantum* diminuiu carga parasitária após 3 meses (ROUGIER et al., 2012). Pineda et al. (2017) observaram que a carga parasitária analisada em linfonodos de cães tratados com marbofloxacina *diminuiu de 16,0 parasitos/ μ L (D0) para 11 parasitos/ μ L no dia (D28), enquanto Rougier et al. (2012) relataram uma carga parasitária média de 26,9 parasitos/ml em D0 e 93,5 parasitos/ml em D84.*

Esses valores são bem inferiores, considerando que o linfonodo é considerado uma amostra de boa qualidade para detecção de DNA de *L. infantum* (MANNA et al., 2008; SOLCÀ et al., 2014), pois é um órgão linfoide bastante envolvido na Lcan, usado muitas vezes como amostra no diagnóstico parasitológico. Entretanto, apesar de uma boa sensibilidade, a punção de linfonodo, é tão invasiva como a medula óssea e muitas vezes o aspirado apresenta escasso material e/ou com presença de gordura e sangue. Enquanto, a medula óssea (amostra alvo do estudo) apesar de ser invasiva, foi cuidadosamente coletada e avaliada em lâminas de microscopia para o controle de qualidade da amostra.

Porém, a medula óssea é uma amostra temida pelos clínicos veterinários, pela dificuldade em coletas e/ou falta de prática, além da necessidade muitas vezes de uma anestesia completa do animal e isso geralmente resulta em oposição dos tutores

dos cães (DE ALMEIDA et al., 2012). No estudo não houve rejeição dos tutores quanto à realização do aspirado, por ser tratar de uma pesquisa científica. Ainda que, uma boa sugestão nesses casos, seria um treinamento de aspirados desse órgão por parte dos médicos veterinários, pois não se deve negar que o parasito tem tropismo pela medula óssea e tem boa viabilidade para detecção do DNA de *Leishmania infantum* (DE ALMEIDA et al., 2012).

Para monitoramento nos tratamentos da Lcan, uma melhor opção para avaliar a carga parasitária seria um acompanhamento a longo prazo, avaliando além da medula óssea, a pele desses animais, uma vez que é o primeiro órgão envolvido na infecção com carga parasitária variável que parece aumentar com a gravidade da doença e, está correlacionada com sua capacidade de infectar flebotomíneos (COURTENAY et al., 2014; BORJA et al., 2016).

A qPCR mostrou ser uma técnica viável para o monitoramento da Lcan, apesar de ter sido utilizado como amostra, a medula óssea, considerado mais invasivo, é um material viável para avaliar carga parasitária. A marbofloxacina com alopurinol mostrou-se viável para a redução a carga parasitária, porém novos estudos poderão demonstrar a redução da infectividade em cães.

5. REFERENCIAS

ALCOVER, M. M., et al. Wild mammals as potential silent reservoirs of *Leishmania infantum* in a Mediterranean area. **Preventive veterinary medicine**, v. 175, p. 104874, 2020.

ALVAR, J. et al. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 2004.57: 2-88

AYRES, M., et al. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Ong Mamiraua. Belém, PA, 2007.

AYRES, E. D. C. B. S. et al. Clinical and parasitological impact of short-term treatment using miltefosine and allopurinol monotherapy or combination therapy in canine visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, 2022.

BANETH G, SOLANO-GALLEGO L. Leishmaniasis. **Veterinary Clinic Small Animals**, v. 52, p. 1359–1375, 2022.

BASTOS, D. S.S *et al.* Could combination chemotherapy be more effective than monotherapy in the treatment of visceral leishmaniasis? A systematic review of preclinical evidence. **Parasitology**, v. 149, n. 6, p. 751-764, 2022.

BORJA, L. S. *et al.* Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p. 110-117, 2016.

BRASILEISH - Grupo de Estudo em Leishmaniose Animal. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina. Ed. Agitta, Três Lagoas – MS, 2018.

CANTOS-BARREDA, A. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in saliva of dogs. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 73, p. 101542, 2020.

COURA-VITAL W, *et al.* Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Aug;5(8):e1291. 2011.

COURTENAY, O. *et al.* Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2583, 2014.

DANTAS-TORRES F., *et al.* Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends Parasitology**, Dec;28(12):531-8, 2012.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Culling dogs for zoonotic visceral leishmaniasis control: The wind of change. **Trends Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 97-101, 2019.

DE ALMEIDA F., Sidney *et al.* Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 4, p. e1596, 2012.

DOS SANTOS NOGUEIRA, F. *et al.* Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2019.

FRANCINO, O., *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

GALLUZZI, Luca *et al.* Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 11, p. 1-13, 2018.

HOSSAIN, F. *et al.* Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0185606, 2017.

MATSUMOTO, P. S. S., *et al.* The path of canine visceral leishmaniasis versus the path of Center for Zoonoses Control: contributions of spatial analysis to health. **Cadernos de Saúde Pública**, v.38, n.1, e00272020, 2022.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Nota Técnica No 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa** Nota Técnica. [s.l: s.n.], 2016. Acesso em 05 de março de 2023.

MIRÓ, G., *et al.* Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trend in Parasitology**, v.24, p.371-377, 2008.

MIRÓ G, *et al.* Multicentric controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 397-404, 2009.

MORALES-YUSTE M, MARTÍN-SÁNCHEZ J, CORPAS-LOPEZ V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 387, 2022.

NUNES JB, *et al.* Comparative analysis of real-time PCR assays in the detection of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. ;117(10):3341-3346, 2018.

PINEDA, C. *et al.* Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0185981, 2017.

REGUERA, R. M. *et al.* Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 227, p. 98-114, 2016.

ROCHA, M. A. N., *et al.* Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 78, 609-614, 2018.

ROUGIER, S. *et al.* One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 245-253, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, p. 676-680, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasite & Vectors**, v. 4, p. 1-16, 2011.

SOLCÀ, M. D. S. *et al.* Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **Public Library of Science (PLoS) One**, v. 9, n. 7, p. e103635, 2014.

VITALE, F., *et al.* TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1026, 139–143, 2004.

APÊNDICE

Apêndice 1. Termo de consentimento livre e esclarecido.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – CIAEP 02.0222.2020
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa intitulada Avaliação do tratamento de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* com diferentes protocolos experimentais, sob a responsabilidade do pesquisador Lúcio Camara Alves, a qual pretende fazer a avaliação da miltefosina em combinação com o alopurinol em cães infectados por *Leishmania infantum*. Sua participação com seu animal particular é voluntária e se dará enquanto o mesmo estiver fazendo o tratamento, onde serão examinados em intervalos regulares nos dias 0 (D0), 30 (D30), 45 (D45), 90 (D90) e 180 (D180). Durante o monitoramento, serão coletados sangue total e soro para a realização de testes sorológicos. No D0 e D180 serão coletadas amostras de Medula óssea.

Os riscos decorrentes da participação dos seu (s) animal (is) na pesquisa são pesquisa são, principalmente, a falta da resposta do animal ao tratamento. O tempo para avaliar a resposta terapêutica será de 15 dias, caso o animal não responda nesse intervalo, será instituído um novo protocolo. Se você aceitar participar, os resultados decorrentes do estudo com seu (s) animal (is) estará contribuindo para uma nova fonte de tratamento para animais positivos para Leishmaniose Visceral.

O Médico Veterinário responsável pelo (s) seu (s) animal (is) será a Dra Janilene Oliveira inscrita no CRMV sob o nº 4730. Além dele, a equipe do Prf. Leucio Camara Alves também se responsabilizará pelo bem-estar do (s) seu (s) animal (is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Leucio Camara Alves ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: (81) 3320-6422; (81) 8415-8542

Equipe: Winny Gomes, Janilene Oliveira

Endereço: Laboratório de Doenças Parasitárias - R. Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900

Telefone: (81) 3320-6422

Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem prejuízo a sua pessoa. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade e de seu (s) animal (is) não serão divulgadas, sendo guardada em sigilo.

Declaração de consentimento pós-informação

Eu, _____, fui devidamente esclarecido (a) sobre todos os procedimentos do projeto **Avaliação do tratamento de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* com diferentes protocolos experimentais**, seus riscos e benefícios ao (s) animal (is) pelo (s) qual (is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu (s) animal (is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do (s) meu (s) animal (is) identificado (s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador

Recife - PE, / /

Assinatura do participante
Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

Assinatura do Pesquisador Responsável

Nome do participante:

Documento de Identidade do participante:

Identificação do (s) animal (is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome:

Número de identificação:

Espécie:

Raça:

Apêndice 2. Modelo de Ficha de acompanhamento dos grupos estudados.

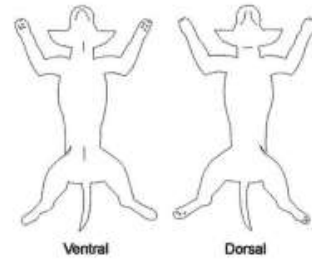
FICHA DE ACOMPANHAMENTO – PROJETO MARBOFLOXACINA

DIA: _____
Data: ____/____/____
Nome do animal: _____ Tutor: _____ Ficha: _____
Peso: _____

EXAME FÍSICO

Exame dermatológico

- a) Alopecia () Ausente () suave () Moderado () severo
- b) Onicogribose () Ausente () suave () Moderado () severo
- c) Paroniquia () Ausente () suave () Moderado () severo
- d) D. descamativa () Ausente () suave () Moderado () severo
- e) D. ulcerativa () Ausente () local () generalizado
- f) D. nodular () Ausente () local () generalizado
- g) D. pustular () Ausente () local () generalizado
- h) D. papular () Ausente () local () generalizado



Exame oftálmico

Sinais oculares (conjuntivite, queratite, uveíte): () Ausente () suave () Moderado () severo

Sinais gastrointestinais () Ausente () suave () Moderado () severo _____

Problema articular () Ausente () suave () Moderado () severo _____

Distúrbios miccionais () Ausente () suave () Moderado () severo _____

Epistaxe: () Ausente () suave () Moderado () severo _____

Linfadenomegalia () Ausente () local () generalizado: _____

Apetite: () Normorexia () Hiporexia () anorexia () Polifagia

Parâmetros vitais

FC: _____ FR: _____ Temp: _____ TPC: _____ Mucosas: _____

COLETAS

Punção medular: () não () sim () *esternal* () *iliaca* () - () +

Biopsia de pele: () não () sim _____

TRATAMENTO

MARBOFLOXACINA: 2m/kg SID 28 dias.

Tratamento oftálmico: _____

Tratamento de suporte: _____

Queixas: _____

Recomendações: Uso de repelente, inseticida spot-on e colar contra flebótomos a fim de evitar uma re-infecção pelo parasito.

Escala numérica de pontuação: 0- ausente; 1- suave; 2 -moderado e 3 - severo
0- ausentes; 1- local e 2- generalizado
Adaptado de Rougier et al (2012)

A soma dos escores clínicos:

ANEXOS

Anexo 1. Estadiamento clínico, manejo e tratamento da leishmaniose canina baseado na sorologia, sinais clínicos e achados laboratoriais.

Estádios clínicos	Sorologia ¹	Sinais clínicos	Resultados laboratoriais	Terapia ²	Prognóstico
ESTÁDIO I Sem doença	Positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico negativo	Ausentes	Sem alterações	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴	Bom
ESTÁDIO II Sem Doença / Doença leve	Negativa ou positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico positivo	Sinais clínicos ausentes a leves, como linfadenopatia periférica, dermatite papular	Geralmente sem alterações. Perfil renal normal	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina	Bom
ESTÁDIO III Doença moderada	Positiva com níveis de anticorpos baixos a altos / parasitológico positivo	Sinais do Estádio II, além de outros como esões neas ifusas ou imétricas, onicogribose, dermatite exfoliativa, onicogribose/ ulcerações, anorexia, epistaxis, febre, emagrecimento	Anemia não regenerativa leve, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade do soro (proteínas totais >12 g/dl) oriundos da formação de imunocomplexos, tais como uveíte e glomerulonefrite. Subestádios a) Perfil renal normal (Creatinina <1,4 mg/dl; RPC <0,5 b) Creatinina <1,4 mg/dl; RPC = 0 5-1	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da nefropatia e controle PSS	Bom a reservado
ESTÁDIO IV Doença grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo	Sinais do Estádio III, sinais originários de lesões por imunocomplexo s: vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite	Alterações do Estádio III, além de DRC no Estádio 1 (RPC >1) ou 2 (creatinina 1,4-2 mg/dl) da IRIS	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Reservado a pobre
ESTÁDIO V Doença muito grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo	Sinais dos Estádio IV, além de tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio final	Alterações do Estádio IV, além de DRC no estágio III (creatinina 2,1-5 mg/dl) e IV (creatinina > 5 mg/dl) da IRIS, ou síndrome nefrótica (marcada proteinúria com RPC >5)	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Pobre

Abreviações: RIFI (reação de imunofluorescência indireta); DRC (doença renal crônica); IRIS (International Renal Interest Society); PSS (pressão sistêmica sanguínea); RPC (razão proteína-creatinina urinárias).

1Em cães soronegativos ou com níveis de anticorpos baixos ou médios, a infecção deve ser confirmada por meio de citologia, histologia, imuno-histoquímica e/ou PCR. Níveis altos de anticorpos (aumento de 3-4 vezes acima do ponto de corte ou cut-off pré-estabelecido de um laboratório de referência) são conclusivos para o diagnóstico da LCan (Solano-Gallego et al., 2011; Ribeiro et al., 2013).

2Monitorar a cada 4 a 6 meses com exames sorológicos, parasitológicos e/ou moleculares, exames gerais para estadiamento e revisão de tratamento (Ribeiro, 2016; Leishvet, 2018).

3Imunoterapia com a vacina LeishTec: um frasco aos 0, 14 e 28 dias em animais infectados (Toepp et al., 2018) ou dois frascos nos dias 0, 21 e 42, em monoterapia ou associada ao alopurinol, com reforços semestrais (Ribeiro et al., 2013, 2017).

4Imunomodulação com domperidona: 0,5-1 mg/kg duas vezes ao dia por 30 dias (Gómez-Ochoa et al., 2009).

Anexo 2. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFRPE.



UNIVERSIDADE
FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do tratamento de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* submetidos diferentes protocolos experimentais", protocolada sob o CEUA nº 8764010520 (ID 000303), sob a responsabilidade de **Leucio Camara Alves e equipe; Winny Gomes de Oliveira Silva ; Wagner Wesley Araujo Andrade; Maria de Lara Oliveira Lima; Janilene de Oliveira Nascimento; Roseane Oliveira Feitosa; Letícia Maximiano Bezerra; Talita Nayara Bezerra Lins; MARIA VANUZA NUNES DE MEIRELES; Caio Felipe Cavalcanti de Andrade Gomes; Carlos Adriano de Santana Leal; Cassia de Freitas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) na reunião de 19/06/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of different protocols of treatment in dogs with natural infection of *Leishmania infantum*", utilizing 60 Dogs (males and females), protocol number CEUA 8764010520 (ID 000303), under the responsibility of **Leucio Camara Alves and team; Winny Gomes de Oliveira Silva ; Wagner Wesley Araujo Andrade; Maria de Lara Oliveira Lima; Janilene de Oliveira Nascimento; Roseane Oliveira Feitosa; Letícia Maximiano Bezerra; Talita Nayara Bezerra Lins; MARIA VANUZA NUNES DE MEIRELES; Caio Felipe Cavalcanti de Andrade Gomes; Carlos Adriano de Santana Leal; Cassia de Freitas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/UFRPE) in the meeting of 06/19/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 06/2020 a 05/2023 Área: Medicina Veterinária

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Cães

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 1 a 10 anos

Quantidade: 60

Linhagem: diversas racas

Peso: 5 a 25 kg

Recife, 16 de julho de 2023

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

