

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Gilsan Aparecida de Oliveira

ANÁLISES CLÍNICAS E EXAMES COMPLEMENTARES DE CÃES INFECTADOS
NATURALMENTE POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS AO TRATAMENTO
COM MILTEFOSINA

RECIFE

2021

GILSAN APARECIDA DE OLIVEIRA

**ANÁLISES CLÍNICAS E EXAMES COMPLEMENTARES DE CÃES INFECTADOS
NATURALMENTE POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS AO TRATAMENTO
COM MILTEFOSINA**

Tese apresentada ao doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Prof^o. Dr. Luiz Carlos Alves

Prof^o. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Sampaio Feitosa

RECIFE

2021

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- O48a Oliveira, Gilsan Aparecida de.
Análise clínicas e exames complementares de cães infectados naturalmente *Leishmania infantum* submetidos ao tratamento com miltefosina / Gilsan Aparecida de Oliveira. — Recife: [s.n.], 2021.
114 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.
Orientadores: Luiz Carlos Alves, Fábio André Brayner dos Santos, Ana Paula Sampaio Feitosa.
1. Leishmaniose visceral canina. 2. Reação em Cadeia da Polimerase. 3. Miltefosina. 4. Basófilos.
I. Alves, Luiz Carlos. II. Santos, Fábio André Brayner dos. III. Feitosa, Ana Paula Sampaio. IV. Título.

CDU 616.993.161

GILSAN APARECIDA DE OLIVEIRA

**ANÁLISES CLÍNICAS E EXAMES COMPLEMENTARES DE CÃES INFECTADOS
NATURALMENTE POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS AO TRATAMENTO
COM MILTEFOSINA**

Tese apresentada ao doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data de aprovação: 29/07/2021

Banca Examinadora

Profº. Dr. Luiz Carlos Alves
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Profº. Dr. Lindomar José Pena
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Profº. Dra. Zulma Maria de Medeiros
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Profª. Drª. Rosangela Zacarias Machado
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista

Drª. Renata dos Santos Almeida
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

*Dedico não só a realização deste trabalho,
mas a minha vida à Deus. Autor da minha fé.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre ao meu lado dando-me o privilégio de sentir sua presença em todos os momentos da minha vida. Por mostrar que o espírito Santo de Deus que habita em mim é maior e mais forte do que tudo. Por me fazer vivenciar em espírito e em verdade todas as Suas palavras. E finalmente por me amar, cuidar de mim. Por me dar forças, sabedoria, inteligência e paciência. Por me ensinar a amar a todos sem distinção me dando sua maior demonstração de amor a seguir que é Jesus. E por realizar todos os desejos do meu coração, mesmo os pequeninhos. Te amo! Te adoro em espírito e em verdade!

À minha mãe, Gilsam de Oliveira, por me mostrar e ensinar com amor e entusiasmo o mundo maravilhoso do conhecimento. Por me fazer entender o verdadeiro significado do amor. Por mostrar que com fé, força e determinação nada é impossível. Te amo mamãe!!! Ao meu pai, José Antônio, que do seu jeitinho esteve sempre ao meu lado, mostrando que nunca estaria sozinha.

Ao meu irmão, Jefferson Augusto, por ser meu amigo e companheiro de vida. Por ser um exemplo de determinação, fé e trabalho. Por estar sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins. Por ter me dado Helena, minha sobrinha linda, meu xodó e minha cópia em miniatura. Amo vocês. À minha irmã, Eliane Torres, por sempre me escutar e estar sempre ao meu lado me dando conselhos e palavras doces de entusiasmo e carinho.

Ao meu sobrinho-filho, Guilherme Torres, por ser meu companheiro de jornada, por dividir todos os momentos comigo e por me amar tanto. Você é um presentinho de Deus para mim. Te amo!

Ao meu amor, Marcos Herculano, pelos conselhos, por estar sempre ao meu lado, por tornar meus dias mais leves, por me fazer rir mesmo querendo chorar. Por me apoiar em todos os momentos, me incentivando. Por todas as orações que fizemos juntos. Por sonhar junto comigo. Por ser esse exemplo de determinação e profissionalismo. Te admiro e te amo cada dia mais. Grata à Deus por nos proporcionar tantos encontros em meio a tantos desencontros ao longo desses seis anos.

Ao Reitor e ao Vice-Reitor do CESMAC, Dr. João Sampaio filho e Prof. Douglas Apratto, por terem tornado meu sonho de fazer o doutorado na Fiocruz de Pernambuco possível. Por me apoiarem em todos os momentos. Por toda palavra de entusiasmos, apoio e conselhos. Aos senhores meu eterno carinho, respeito, admiração e gratidão.

Aos meus eternos orientadores, Profa. Aparecida Faustino e Prof. Leucio Câmara, por terem sido um exemplo de profissionais e seres humanos em minha vida. Por terem me

apresentado o mundo das pesquisas minha eterna paixão. Agradeço também a toda equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRPE, especialmente a Marilene, Vânia, Simone, Gilcia, Carlos, Rafael, Giulliano, Danillo, Sandra, Ednilse, Lucila e nossa querida Guiomar.

Á Dra. Milena Paiva por abrir as portas da Fiocruz para realizar meu sonho de fazer o doutorado nesta instituição, pelos ensinamentos e trabalhos desenvolvidos. À professora Janaína, por toda ajuda dada, por não deixar meu sonho acabar. Por acreditar em mim e ter sido um instrumento de Deus em minha vida. A profa. Cristina Massoco e profa. Rosangela Zacarias por todos os ensinamentos, carinho e atenção ao me receberem na USP e UNESP, respectivamente, e colaborarem com meus estudos.

Aos meus orientadores, Luiz Alves, Ana Sampaio e Fábio Brayner, por terem sido verdadeiros presentes de Deus em minha vida. Por torarem possível o impossível aos olhos humanos. Por terem aberto as portas para mim no último momento, quando todos fecharam. Por terem acreditado em mim, por nunca terem desistido de mim. Por me ensinarem que um verdadeiro mestre é aquele que inclui, que não desiste, que te puxa, que te direciona, que te anima e o mais importante que não desiste de você. Obrigada por todo amor! Amo vocês!

Aos meus professores excelentes professores de doutorado: Lindomar Pena; Regina Bressen e Antônio; Clarice, Isabela e Rafael; Norma, Renata e Poulin; Cristina Peixoto e Amanda.

À Cleidinha e Dona Fátima pelas conversas risadas e cafezinho. Por me fazerem sentir amada e acolhida. À Marcia e Adagilson por ser essa bibliotecária carinhosa e atenciosa. À Dette por sempre me atender com todo carinho e presteza sempre.

Finalmente e não menos importantes meus eternos amigos que a Fiocruz me deu de presente por todas as brincadeiras, risadas, acolhimento, brigas, carinhos, conselhos e trabalhos realizados: Rayanna, Rômulo, Vitinho, Kamila, Aninha, Rubens, Alberon, Debys, Tayná, Gabi, Alex, Dani, João, Amandinha, Gabriel, Paulinha. Aos meus amigos de infância que sempre estão juntas mesmo longe: Isabella, Rachel, Juliana, Priscilla, Celinha e Paulinho. As minhas amigas de trabalho e pessoal também: Raíssa, Mariah, Valesca, Carol, Isabelle, Claudia e Vitória por todo carinho, união, ajuda no trabalho. Por tudo! Amo vocês!

A minha banca que de forma muito amável aceitou o convite: Prof. Lindomar, Profa. Rosangela, Profa. Zulma, Renata e Prof. Fabrício. A vocês minha gratidão, admiração, respeito e carinho.

A Fiocruz Pernambuco por me ofertar um ensino de qualidade, do qual me orgulho muito e que com certeza ajudará a fazer a diferença no Estado de Alagoas. Muito Obrigada, Prof. Lindomar Pena e Profa. Sheilla Oliveira por serem coordenadores maravilhosos!

“Assim, permanecem agora estes três: a fé, a esperança e o amor.

O maior deles, porém, é o amor”

Coríntios 13:13

OLIVEIRA, Gilsan Aparecida de. **Análises clínicas e exames complementares de cães infectados naturalmente por *Leishmania infantum* submetidos ao tratamento com miltefosina.** 2021. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose parasitária de alta letalidade quando não tratada. O cão é o principal reservatório, e por esta razão a eutanásia é a principal forma de controle da LVC. Diante disto, a miltefosina 2%, foi autorizada para o tratamento da LVC. Contudo, pouco se sabe sobre a ação da miltefosina em cães nas diferentes fases clínicas. Objetivou-se realizar uma análise preditiva nos cães nas diferentes fases clínicas. Foi realizado um estudo experimental não randomizado na Clínica Escola de Medicina Veterinária do CESMAC/Marechal Deodoro-AL. Os cães foram atendidos na referida clínica, independente da origem ou presença de sinais clínicos. Inicialmente foi realizado o exame físico-clínico e coleta sanguínea para diagnóstico de *L. infantum* pelos testes de DPP, ELISA e RIFI. A qPCR foi aplicada na identificação e quantificação usando o sistema LINF 1B com utilização de SYBR Green, que detecta fragmento do kDNA. Foram realizadas análises hematológicas, bioquímicas e RT- qPCR. Os 4 grupos com 5 animais cada foram divididos em: cães doentes (G1); cães infectados (G2), cães expostos (G3) e controle negativo (G4). Os animais foram avaliados no dia zero (início do tratamento), 20 e 30 dias do início do tratamento com miltefosina 2% na dose 1mL/10kg/dia por 28 dias. Os níveis de IgG aumentaram e a carga parasitária reduziu no G1 e G2. Houve melhora clínica em 20%, 40% e 80% do G1, G2 e G3, respectivamente. Houve restabelecimento hepático morfológico em 100% dos cães. A anemia normocítica, normocrômica, hiperproteinemia, hiperglobulinemia e redução de ALT esteve em todos os grupos tratados. Identificou-se aumento de basófilos no G1 e G2 e diminuição de monócitos. Níveis de IL-4, IL-10 e IFN- γ não foram expressos. O tratamento apesar de propiciar melhora clínica, redução da carga parasitária e restabelecimento hepático, demonstrou através dos níveis de IgG e dos biomarcadores hematológicos uma tendência rápida ao restabelecimento da infecção.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina. Reação em Cadeia da Polimerase. Miltefosina. Basófilos.

OLIVEIRA, Gilsan Aparecida de. **Clinical analyzes and complementary exams of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* submitted to treatment with miltefosine.** 2021. Thesis (Doctorate in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2021.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a parasitic zoonosis with high lethality when untreated. The dog is the main reservoir, and for this reason euthanasia is the main form of control of CVL. Therefore, a 2% miltefosine was authorized for the treatment of CVL. However, little is known about the action of miltefosine in dogs at different clinical stages. The objective was to perform a predictive analysis in dogs in different clinical stages. A non-randomized experimental study was carried out at the Clinical School of Veterinary Medicine of CESMAC / Marechal Deodoro-AL. The dogs were treated at the clinic, regardless of the origin or presence of indicators. Initially, the physical-clinical examination and blood collection for the diagnosis of *L. infantum* were performed using the DPP, ELISA and RIFI testicles. qPCR was applied for identification and quantification using the LINF 1B system using SYBR Green, which detects kDNA fragments. Hematological, biochemical and RT-qPCR analyzes were performed. The 4 groups with 5 animals each were divided into: sick dogs (G1); infected dogs (G2), exposed dogs (G3) and negative control (G4). The animals were taken on day zero (start of treatment), 20 and 30 days after the start of treatment with 2% miltefosine at a dose 1mL / 10kg / day for 28 days. IgG levels increased and the parasite load decreased in G1 and G2. There was clinical improvement in 20%, 40% and 80% of G1, G2 and G3, respectively. There was morphological hepatic recovery in 100% of the dogs. Normocytic, normochromic anemia, hyperproteinemia, hyperglobulinemia and ALT reduction were found in all treated groups. An increase in basophils in G1 and G2 and a decrease in monocytes was identified. IL-4, IL-10 and IFN- γ levels were not expressed. The treatment, despite the clinical improvement, reduction of the parasite load and liver recovery, through the levels of IgG and hematological biomarkers, a rapid tendency to reestablish the infection.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis. Real-time Polymerase Chain Reaction. Miltefosine. Basophils.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Forma evolutivas de <i>Leishmania</i> .	26
Figura 2 -	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp. em mamíferos e flebotomíneos	28
Figura 3 -	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp. em um vetor competente: Tempo <i>versus</i> formas evolutivas	29
Figura 4 -	Classificação da <i>Leishmania infantum</i>	30
Figura 5 -	Distribuição geográfica dos novos casos de leishmaniose visceral em 2015	31
Figura 6 -	Resposta imune do hospedeiro à <i>Leishmania</i> spp.	35
Figura 7 -	Biomarcadores e parâmetros hematológicos e bioquímicos geralmente presentes em cães susceptíveis e resistentes a infecção por <i>L. infantum</i> .	36
Figura 8 -	Molécula da Miltefosina	43
Figura 9 -	Interação do LPG com os receptores de membrana do macrófago e ação na via de sinalização do óxido nítrico	44
Figura 10 -	Proposta do mecanismo de ação leishmanicida da miltefosina	45
Figura 11 -	Clínica Escola de Medicina Veterinária do Centro Universitário Cesmac	53
Figura 12 -	Fluxograma de diagnóstico e sinais clínicos direcionado ao estabelecimento do status clínico do cão de áreas endêmicas para LVC	54
Quadro 1	Disposição da forma dos grupos adaptados da sugestão do <i>Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG)</i>	55
Figura 13 -	Fluxograma ilustrativo do desenho experimental	56
Figura 14 -	Exame clínico: auscultação	57
Figura 15 -	Exame clínico: Palpação	57

Figura 16 -	Contenção para coleta	58
Figura 17 -	Coleta sanguínea	58
Figura 18 -	Centrífuga	59
Figura 19 -	Soro	59
Figura 20 -	Esfregaço sanguíneo	59
Figura 21 -	ELISA	60
Figura 22 -	RIFI	60
Figura 23 -	Kit DPP	60
Figura 24 -	DPP positivo	60
Figura 25 -	DPP fraco positivo	60
Figura 26 -	DPP Negativo	60
Figura 27 -	Amostra positiva com curva de Melt com temperatura próxima de 80°C	61
Figura 28 -	Pelet de <i>L.infatum</i>	63
Figura 29 -	Curva de logarítmica de DNA <i>L.infatum</i> de 1 ng a 1fg	63
Figura 30 -	Termociclador QuatStudio 5	64
Figura 31 -	Punção de Medula	65
Figura 32 -	Punção de linfonodo	65
Figura 33 -	<i>Ehrlichia canis</i>	65
Figura 34 -	<i>Anaplasma platys</i>	65
Figura 35 -	Extração de RNA	68
Figura 36 -	Qubit	68
Figura 37 -	Gel de agarose 1%	68
Figura 38 -	Termociclador	68
Figura 39 -	Condições de ciclagem	68

Figura 40 -	Esquema geral de opções de síntese de cDNA e tipos de análises usando ImProm-II™ Reverse Transcription System.	69
Figura 41 -	Condições de ciclagem utilizada para quantificação dos genes alvos e de referência	70
Figura 42 -	Fluxograma de diagnóstico do grupo exposto	75
Figura 43 -	Fluxograma de diagnóstico do grupo infectado	76
Figura 44 -	Fluxograma de diagnóstico do grupo doente	76
Gráfico 1 -	Carga Parasitária dos animais infectados submetidos ao tratamento com miltefosina 2% nos tempos 0, 20 e 30 dias.	77
Gráfico 2 -	Carga Parasitária dos animais doentes submetidos ao tratamento com miltefosina 2% nos tempos 0, 20 e 30 dias.	77
Figura 45 -	Evolução clínica do paciente Shwiro.	78
Figura 46 -	Evolução clínica da paciente Megg.	78
Quadro 2 -	Alterações clínicas identificadas durante o monitoramento do grupo exposto	79
Figura 47 -	Evolução clínica do paciente Bradock.	79
Quadro 3 -	Alterações clínicas identificadas durante o monitoramento do grupo infectado	80
Quadro 4 -	Alterações clínicas identificadas durante o monitoramento do grupo doente	80
Gráfico 3 -	Valores absolutos obtidos após análise ultrassonográfica esplênica em cães nos diferentes grupos	81
Gráfico 4 -	Valores absolutos obtidos após análise ultrassonográfica hepática em cães nos diferentes grupos	81
Figura 48 -	Esplenomegalia com presença de nódulos	81
Figura 49 -	Baço com ausência de nódulos ao final do tratamento	81
Gráfico 5 -	Valores médios de eritrócitos comparados entre grupos nos diferentes tempos.	83

- Gráfico 6** - Valores médios de plaquetas comparados entre grupos nos diferentes tempos. 83
- Gráfico 7** - Basófilos com significância estatística entre os diferentes tempos 85
- Gráfico 8** - Monócito nos diferentes tempos entre os grupos 85
- Figura 51** - Resultado da qPCR ilustrando a amplificação da curva do gene endógeno e a não amplificação ou ruídos dos genes alvos analisados 87

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Monitoramento sorológico dos cães no grupo exposto em diferentes tempos tratados com miltefosina 74
- Tabela 2** - Monitoramento sorológico dos cães no grupo infectado em diferentes tempos tratados com miltefosina 74
- Tabela 3** - Monitoramento sorológico dos cães no grupo doente em diferentes tempos tratados com miltefosina 74
- Tabela 4** - Monitoramento sorológico dos cães no grupo controle em diferentes tempos sem tratamento 75
- Tabela 5** - Análise das médias e desvio padrão dos valores hematológicos obtidos nos diferentes grupos em cada tempo de tratamento com miltefosina 2% 82
- Tabela 6** - Análise das médias e desvio padrão dos valores hematológicos obtidos nos diferentes tempos de cada um dos grupos tratados com miltefosina 2%. 82
- Tabela 7** - Valores da média e desvio padrão da série leucocitária em diferentes tempos de cada grupo tratado com miltefosina 2% nas diferentes fases clínicas. 84
- Tabela 8** - Monitoramento com médias \pm desvio padrão dos parâmetros bioquímicos observados nos diferentes tempos em cada grupo tratado com miltefosina 2% 86

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
A2	Antígeno 2
ABI	Applied Biosystems
AL	Alagoas
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransaminase
Anova	Análise de Variância
AMP cíclico	3':5'- Adenosina-Monofosfato-cíclico
CD	Grupamento de diferenciação
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CLWG	<i>Canine Leishmaniasis Working Group</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
cPCR	PCR convencional
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DCs	Células dendríticas
DLA	Antígeno Leucocitário haplótipos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP	<i>Dual Plate Platform</i>
ECM	Matriz Extracelular
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Fluorescência

FML	Fucose Monose Ligante
FN	Fibronectina
FoxP3+	<i>Forkhead FoxP3+</i>
G	Gramma
GP63	Glicoproteína 63
GPI	Glicosil Fosfadil-Inositol
gRNA	Ácido Ribonucleico guia
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL-12p40	Interleucina -12 subunidade da proteína 40
IL-1 β	Interleucina -1 Beta
iNOS	Oxido nítrico-sintase induzível
K39	Proteína K 39
kDNA	DNA do cinetoplasto
Kg	Quilograma
LACEN	Laboratório Central
LAMP	Amplificação Isotérmica Mediada por Loop
LF	Fluxo Lateral
LN	Laminina
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeos
LiESP	Fatores Excretados e Secretados de Formas Promastigotas de <i>L. infantum</i>
LV	Leishmaniose visceral

LVC	Leishmaniose visceral canina
LV	Leishmaniose visceral
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
Mm	Milimetro
mM	Milimolar
MPA	Medicação Pré-Anestésica
MS	Ministério da Saúde
NADP oxidase	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidase
NF-κB	Fator nuclear κ de Células B
NF-AT	Fator Nuclear T de Células Ativadas
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NLRs	Receptores de Ligação de Nucleotídeos
NO	Oxido Nítrico
NODs	Receptores do tipo Domínio de Oligomerização de ligação ao Nucleotídeo
NPT	Núcleo de Plataforma Tecnológica
NTC	<i>Non template control</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associadas ao patógeno
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Pernambuco

PHA	Fito-hemoaglutinina
QA-21	Quimera de Antígeno A-21
qPCR	PCR quantitativa
qRT-PCR	Transcriptase Reversa por Reação em Cadeia da Polimerase
Quil A	Quimera A
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rDNA	DNA ribossômico
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
RPA	Amplificação da Polimerase Recombinase Isotérmica
RPA-LF	Amplificação da Polimerase Recombinase Isotérmica de Leitura Lateral
r.p.m	Rotação por Minuto
SMF	Sistema Monocítico Fagocitário
TCD8+	Células T CD8
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF α	Fator de Transformação do Crescimento alfa
TGF β	Fator de Transformação do Crescimento beta
Th1	<i>T helper cells 1</i>
Th2	<i>T helper cells 2</i>
TLRs	Receptores <i>Toll-Like</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Treg	Células T regulatória
TRI	Teste Rápido Imunocromatográfico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1 Tripanosomatídeos	25
2.2 O gênero Leishmania	25
2.3 Ciclo de vida da Leishmania spp.	28
2.4 Leishmaniose no Brasil	29
2.5 Epidemiologia	30
2.5.1 Distribuição geográfica da leishmaniose visceral	31
2.5.2 Reservatórios	32
2.6 Patogenia da leishmaniose visceral canina	32
2.7 Imunopatogenia da leishmaniose visceral canina	33
2.8 Resposta humoral e celular	34
2.9 Sinais clínicos da LVC	37
2.10 Diagnóstico da LVC	38
2.11 Diagnóstico complementar da LVC	40
2.12 Controle da leishmaniose visceral	41
2.13 Profilaxia da leishmaniose visceral canina	41
2.14 Tratamento	42
2.14.1 Legalização do tratamento da LVC	42
2.14.2 Miltefosina.....	43
2.14.2.1 <i>Estudo da resposta imune em cães submetidos ao tratamento com miltefosina</i>	45
2.14.2.3 <i>Associação com outros fármacos</i>	46
2.14.3 Outros fármacos.....	46
3 JUSTIFICATIVA	48
4 PERGUNTA CONDUTORA	49
5 HIPÓTESE	50
6 OBJETIVO GERAL	51

6.1 Objetivos específicos	51
7 MATERIAL E MÉTODOS	52
7.1 Tipo de estudo	52
7.2 Local da pesquisa	52
7.3 Amostra e amostragem	53
7.4 Desenho Experimental	55
7.5 Exame Clínico (caracterização clínica dos cães)	56
7.6 Coleta sanguínea	57
7.7 Processamento e armazenamento das amostras	58
7.8 Diagnóstico sorológico	59
7.8.1 Testes sorológicos para <i>L. infantum</i> : ELISA, RIFI e DPP	59
7.8.2 Diagnóstico molecular usando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para <i>Leishmania infantum</i> :	60
7.8.2.1 Extração de DNA.....	61
7.8.2.2 Preparação e aplicação do Master Mix.....	63
7.8.2.3 Termociclador.....	63
7.8.3.1 Biópsia de medula e linfonodo para diagnóstico de <i>Leishmania infantum</i>	64
7.8.3.2 Pesquisa de hemoparasita (Pesquisar, identificar a presença de hemoparasitas.....	65
7.8.3 Diagnóstico parasitológico	64
7.9 Exames complementares	66
7.9.1 Análise hematológica (perfil hematológico dos cães).....	66
7.9.2 Análise bioquímica (Verificação da função hepática e renal dos cães)	66
7.9.3 Ultrassom com Doppler (Preservação morfológica dos fígado, baço e rim)	66
7.10 Tratamento endectocida, babesicida, bactericida e leishmanicida	67
7.11 Avaliação da resposta imune frente a infecção por <i>L. infantum</i> (Expressão de citocinas)	67
7.11.1 Extração de RNA.....	67
7.11.2 Síntese de cDNA	68

7.11.3 Avaliação da expressão das citocinas	70
7.14 Análise dos dados	71
8 ASPECTOS ÉTICOS	72
9 RESULTADOS	73
9.1 Resultados sorológicos.....	73
9.2 Resultado da carga parasitária obtida pela qPCR.....	76
9.3 Resultados da análise clínica dos animais antes durante e após o tratamento	77
9.4 Resultados da análise ultrassonográficas dos animais	80
9.5 Resultados da análise hematológica dos animais antes, durante e logo após o tratamento	81
9.6 Resultados da análise bioquímica dos animais antes e após o tratamento.....	86
9.7 Resultados da Expressão gênica	86
10 DISCUSSÃO	88
11 CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS	94
APENDICE A-ARTIGO RELACIONADO PUBLICADO EM REVISTA.....	105
APENDICE B –ARTIGO RELACIONADO PUBLICADO EM REVISTA.....	106
APENDICE C –ARTIGO RELACIONADO SUBMETIDO A REVISTA.....	107
ANEXO A- FICHA CLÍNICA	108
ANEXO B- PARECER CONSUBSTÂNCIADO DO COMITÊ DE ÈTICA NO USO DE ANIMAIS DO CENTRO UNIVERSITÁRIO CESMAC	111
ANEXO C-DECLARAÇÃO DE INFRAESTRUTURA E INSTALAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	113

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças tropicais causadas por diferentes espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (HASHEMI *et al.*, 2018) pertencentes a família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, e transmitidas, por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (BRASIL, 2017). A leishmaniose visceral (LV) é considerada a forma mais grave entre as leishmanioses (NOGUEIRA *et al.*, 2018) e se encontra em franca expansão com um crescente número de vetores e reservatórios (FERROGLIO *et al.*, 2018). O Brasil concentra 14% (3.336) dos focos ecoepidemiológicos, colocando o país em destaque. Brasil, Índia, Sudão do Sul e Sudão registraram mais de 2000 casos de LV, representando 73% dos casos globalmente. Associando esses quatro países mais a Etiópia, Quênia e Somália, juntos representam 90% dos casos de LV relatados em todo o mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Na epidemiologia da doença os cães possuem um papel de destaque por serem considerados importantes reservatórios urbanos de *Leishmania infantum* (TRAVI *et al.*, 2018), apresentando alta carga parasitária na pele especialmente na região do focinho e orelhas (JACINTHO *et al.*, 2018) o que os tornam fonte de infecção aos flebótomos e um elo de transmissão homem/animal (MONTEIRO *et al.*, 2005). Além da pele, o baço também contém uma alta densidade parasitária durante o curso da doença. Contudo, a medula óssea e o baço são os marcadores mais confiáveis para entender o quadro clínico da leishmaniose visceral canina (LVC), quando comparado aos demais órgãos (REIS *et al.*, 2009). Existem, ainda, evidências de que cães soropositivos e sintomáticos apresentam maior risco de infecção aos vetores e por essa razão, devem receber atenção especial nas medidas de controle (CHAVES *et al.*, 2013).

Diante da importância da carga parasitária do reservatório no ciclo de transmissão e nas lesões patológicas observadas nos animais, o uso da biologia molecular mostra ser uma excelente ferramenta para o diagnóstico, pois possui capacidade de detectar até 0,001 e 0,1 parasita/reação, com especificidade que pode variar de 95 a 100%.

A relação com a presença ou ausência dos sinais clínicos são determinados pela resposta imune do hospedeiro à infecção. O animal pode desenvolver uma resposta celular do tipo Th1, e os cães tornarem-se resistentes, ou gerar uma resposta humoral do tipo Th2, com apresentação de sinais clínicos cutâneos e viscerais, graves que podem evoluir para morte (GRADONI, 2015). A resposta imune direcionada por Th1 é mediada por Interferon- γ e TNF- α , predominante nos cães assintomáticos (FREITAS; PINHEIRO, 2010). Um estudo utilizando a

neopterina como biomarcador mostra que o controle efetivo da infecção por *L. infantum* está relacionada à ativação de macrófagos por interferon- γ (IFN- γ) para produzir radicais livres que matam os parasitas intracelulares de *Leishmania* (KIP *et al.*, 2018) e desta forma tem sido relacionada à resistência à doença, enquanto a resposta imune mediada por Th2 tem sido marcada pela produção de IL-4 e IL-10, sendo relatada nos casos sintomáticos. Embora o papel das citocinas liberadas por Th2 nos casos sintomáticos seja controverso, há evidências de sua correlação positiva com a progressão da doença. Contudo, vêm sendo discutidas as atuações dos neutrófilos, mastócitos, basófilos, células natural killer (NK), linfócitos TCD8+ e T regulatórios (Treg) nas leishmanioses (FREITAS; PINHEIRO, 2010).

Os basófilos são células sanguíneas produtoras de IL-4 responsável pela diferenciação das células T naíve em células Th 2, (KARASUYAMA *et al.*, 2021) moldando a resposta imune de Th2, induzindo a produção de imunoglobulinas (SOKOL *et al.*, 2010). O aumento de anticorpos é responsável pela alta parasitemia e progressão da doença com apresentação de cães sintomáticos, sendo as classes mais envolvidas a IgG, IgG2, IgM, IgA e IgE (REIS *et al.*, 2009). Enquanto à resistência a doença está relacionada a maior produção de macrófagos e liberação de IL-12 (SILVA *et al.*, 2018) em cães assintomáticos associados à baixa parasitemia e produção de IgG (REIS *et al.*, 2009). Assim, as alterações hematológicas se apresentam como fortes biomarcadores, especialmente quando associados aos sinais clínicos característicos da LVC (MAIA; CAMPINO, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2020).

Entendendo a importância da carga parasitária dos cães na epidemiologia da doença (REIS *et al.*, 2009), bem como a necessidade de evitar a resistência aos medicamentos utilizados para o tratamento da LV, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Ministério da Saúde (MS) permitiram o uso da miltefosina no tratamento de cães com leishmaniose visceral (BRASIL, 2016). A miltefosina é uma alquilfosfocolinas, com fórmula C₂₁H₄₆NO₄P hexadecil 2-(trimetil azanium) fosfato de etila (hexadecilfosfocolina), de atividade antineoplásica, ação leishmanicida e/ou imunomoduladora. Contudo, seu mecanismo ainda não foi definido. Acredita-se que a droga atua no parasito, provocando apoptose e a alteração das vias de sinalização celular mediada por lipídeos. Sugere-se, ainda que a ação deste fármaco esteja relacionada com a inibição da síntese de lipofosfoglicano (LPG) e glicoproteína 63 (gp63) do parasito (BASTOS *et al.*, 2016).

Apesar de miltefosina ser o único medicamento oral atualmente disponível para o tratamento da leishmaniose, as informações sobre a farmacocinética da miltefosina em animais são escassas (JIMÉNEZ-ANTÓN *et al.*, 2018). Torna-se importante a análise leishmanicida e ação da miltefosina na resposta celular a fim de realizar diferenciação entre a infecção e a

doença progressiva (BOGGIATTO *et al.*, 2010), bem como elucidar o mecanismo de ação da miltefosina no cão sintomático e assintomático e sua resposta imunológica antes, durante e pós-tratamento, e o momento da soroconversão.

Estudos realizados em cães, sintomáticos infectados naturalmente, mostraram que a avaliação simultânea de da carga parasitária associada a outros parâmetros nos diferentes tipos de tecidos pode representar uma ferramenta confiável para avaliar a eficácia da terapia, bem como prever as recaídas durante o tratamento (MANNA *et al.*, 2008). Entendendo que, segundo Manna *et al.* (2008), o tratamento bem-sucedido e a aparência clínica depende parcialmente da carga parasitária e da resposta do hospedeiro. Diante disto é necessário obter mais informação sobre a evolução da carga parasitária, o estado clínico do cão, as alterações morfofisiológicas dos órgãos e a resposta imunológica pelo efeito leishmanicida e imunomodulador da miltefosina em cães em tratamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A leishmaniose visceral é uma doença letal quando não tratada e o seu conhecimento é essencial para adoção de medidas de controle e prevenção que visem a eliminação da enfermidade.

2.1 Tripanosomatídeos

São chamados de tripanosomatídeos um grupo de protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae que apresenta grande relevância por ser uma das mais patogênicas ao homem e a outros animais. Os gêneros dessa família eram classificados apenas pela morfologia e tipo de hospedeiro, no entanto, hoje também é classificada pela análise filogenética. Desta forma, ainda permanece a classificação quanto ao número de hospedeiros que pode ser: dioxenos, ou seja, pode parasitar mais de um hospedeiro, podendo ser estes vertebrados, invertebrados e plantas; e monóxenos que parasitam apenas um hospedeiro, que no caso desta família geralmente são os invertebrados (VOTÝPKA *et al.*, 2015). Os membros dessa família são diferenciados pela morfologia da célula e pela posição do cinetoplasto e flagelo em relação ao núcleo (LOPES *et al.*, 2010).

Desta forma a família está dividida em três gêneros dioxenos que são os gêneros: *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Phitomonas*; e 11 gêneros monóxenos que são: *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Sergeia*, *Wallacemonas*, *Blechomonas*, e *Jaenimonas*, *Angomonas*, *Strigomonas*, e *Kentomonas* (AKHOUDI *et al.*, 2016). Assim a família possui 14 gêneros. A divisão é composta em três subfamílias Leishmaniina, Strigomonadinae e Blechomonadinae (VOTÝPKA *et al.*, 2015).

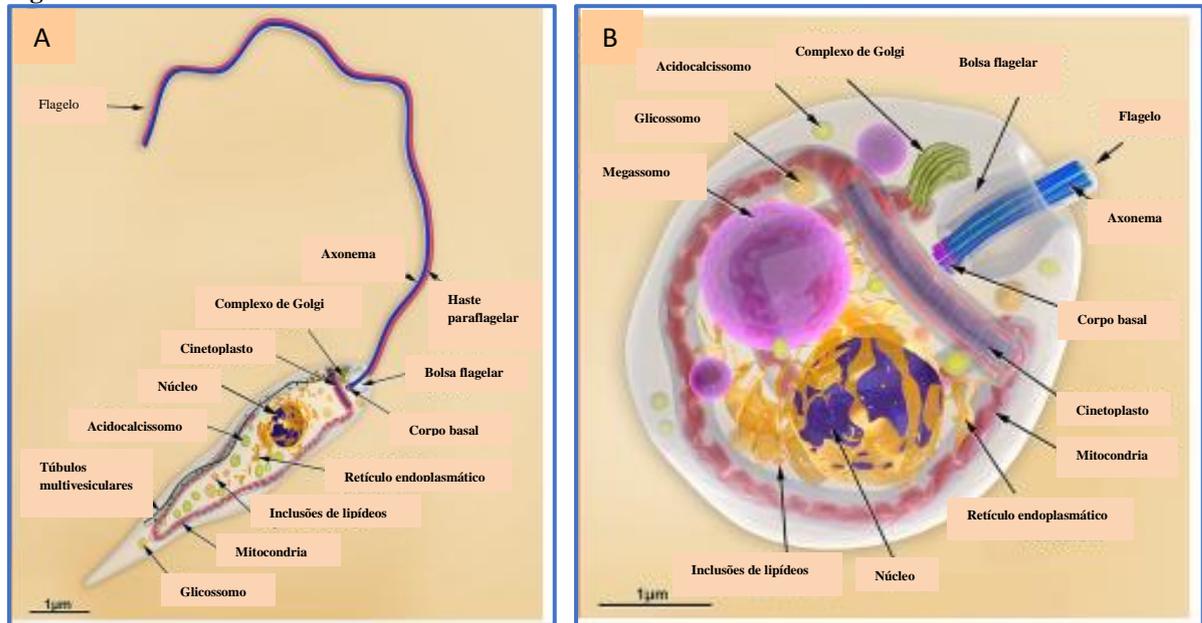
Existem mais de 53 espécies de *Leishmania* incluindo os 5 subgêneros e o complexo *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, complexo *L. enriettii* e *Paraleishmania*, sendo 31 espécies parasitas de mamíferos e 20 patogênicas ao homem (AKHOUDI *et al.*, 2016).

2.2 O gênero *Leishmania*

Trata-se de um protozoário digenético intracelular obrigatório que infectam homens e animais. Apresenta duas formas evolutivas: promastigota, presente nos flebotomíneos e a forma amastigota (Figura 1), presente nos mamíferos, incluindo o homem e o cão. Existem aproximadamente 20 espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* e todas diferentes tanto

morfologicamente quanto geneticamente adaptadas a sobrevivência do parasita no ambiente hostil da célula hospedeira permitindo a infecção (AKPUNARLIEVA; BURCHMORE, 2017).

Figura 1 - Forma evolutivas de *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de Teixeira *et al.* (2013)

Legenda: A: Promastigota. B: Forma Amastigota

A forma promastigota é alongada e mede 5-20 x 1-4µm e o flagelo anterior 20mm emergindo da bolsa flagelar, sendo, portanto, a estrutura exomeal formada por 9 pares de microtúbulos. As amastigotas são elípticas e medem aproximadamente 2 x 4µm (TEIXEIRA *et al.*, 2013). Próximo ao flagelo encontra-se o cinetoplasto, um resquício de mitocôndria, rico em DNA mitocondrial arranjado em maxicírculos e minicírculos (CECCARELLI *et al.*, 2014).

A membrana de ambas as formas evolutivas consegue interagir com a célula hospedeira trocando substâncias. Quando dentro da célula é capaz de utilizar o citoplasma do macrófago por fusão da membrana ou via proteínas transportadoras. O lipofosfoglicano (LPG) é um componente da membrana essencial na relação parasita-hospedeiro. Encontra-se na superfície da promastigota em abundância e está relacionado a aderência ao intestino e é também um fator de virulência para hospedeiro vertebrado.

Ao silenciar o LPG foi possível observar uma boa atividade leishmanicida dos macrófagos da medula dos ratos. A ausência do LPG permite que o fator nuclear K de células B (NF-κB) promova a indução do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) pelos macrófagos da medula óssea de modelos murinos, retardando o crescimento do parasita e reduzindo a sobrevivência do parasita (LÁZARO-SOUZA *et al.*, 2018) com consequente diminuição do número de parasitas nas células hospedeiras.

O reconhecimento parasito-hospedeiro acontece mediante receptores de reconhecimento padrão das células da imunidade inata, especialmente os receptores de ligação de nucleotídeo (NLRs). Os receptores ativam os inflamassomas, responsáveis pela ativação da caspase 1 e maturação de IL-1 β e IL-18 e outra classe de NLRs, chamada NODs, que por sua vez irão ativar as vias que culminam na ativação de NF- κ B (GATTO, 2018) que são essenciais para o iNOS (LÁZARO-SOUZA *et al.*, 2018).

Diante disto, o parasita responde diminuindo a produção de radicais superóxido consequentemente inibindo a montagem da nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), além de expressar enzimas e proteínas antioxidantes que podem servir como alvo de drogas leishmanicidas de ação específica (ASSCHE *et al.*, 2011).

O protozoário é composto pelas organelas e estruturas como: núcleo, retículo endoplasmático, complexo cinetoplasto-mitocôndria, complexo de Golgi, acidocalcissomos e os componentes da via endocítica (TEIXEIRA *et al.*, 2013). Os acidocalcissomos são organelas esféricas que medem aproximadamente 600 nm, possuem características ácida e atividade de cálcio (Ca²⁺) com ATPase, o que originou o seu nome, altas concentrações de fósforo e cálcio e moderadas concentrações de magnésio, sódio, potássio e zinco, dando uma característica eletrodensa no seu interior. Diante dessas características, acredita-se que a principal função desta organela é a osmorregulação (RIBERIO, 2016).

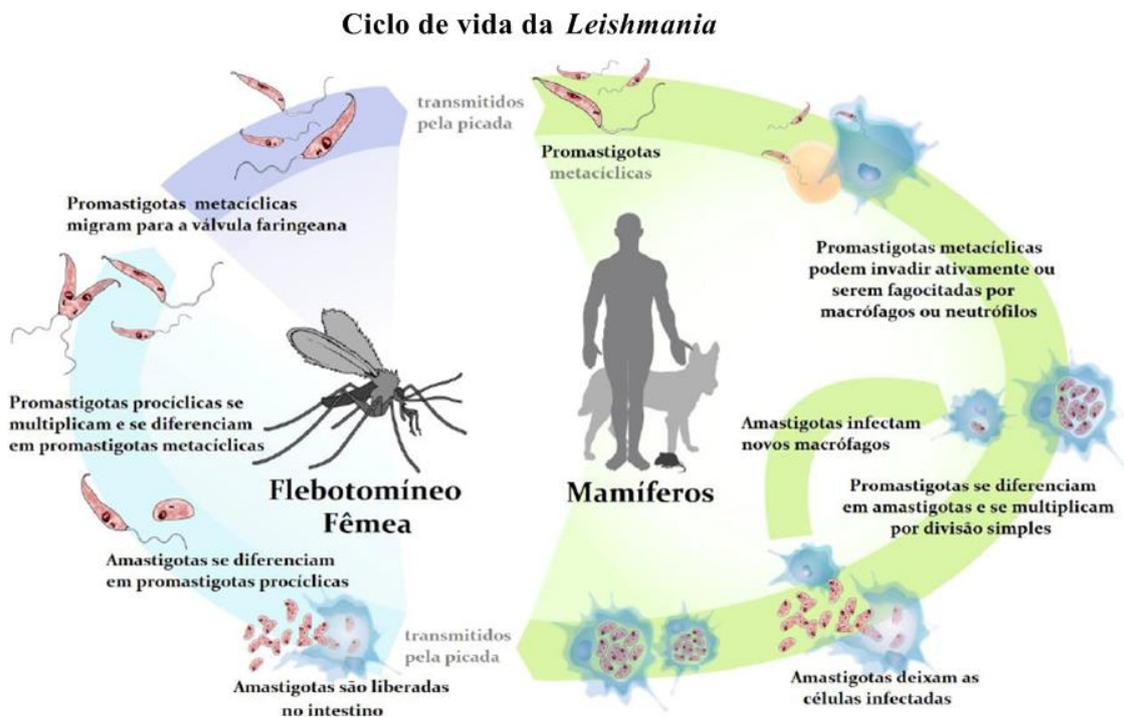
Os glicosomos, assim como a acidocalcissomo tem seu nome sugestivo ao desenvolvimento de sua função. As organelas são ricas em enzimas essenciais à via glicolítica como β -oxidação de ácidos graxos, metabolismo de peróxido, síntese de éter-lipídios, esteróis, síntese de aminoácidos, pirimidinas e enzimas da via de recuperação de purinas as quais ficam compartimentalizadas evitando o acúmulo nocivo desses compostos. Morfologicamente são redondos e medem cerca de 0,7 μ m de diâmetro e estão presentes em todo o citoplasma do parasita. Contudo, pode variar em quantidade conforme a forma evolutiva do protozoário, e a variedade de gasto energético nos diferentes estádios (RIBERIO, 2016).

Os megassomos são organelas grandes, porém podem variar de tamanho e em número, dependendo da espécie. São compostos por fosfatase ácida e cisteína-proteinase tornando-os eletrodensos. Estão presentes apenas nas amastigotas podendo variar de tamanho mesmo entre espécies. Eles têm a função de armazenar as macromoléculas oriundas da digestão do parasita. Além de estar envolvido, possivelmente com a virulência da *Leishmania* spp. (RIBERIO, 2016).

2.3 Ciclo de vida da *Leishmania* spp.

O ciclo de vida é considerado relativamente simples, apresentando duas fases, promastigota no intestino do vetor e amastigota nos macrófagos do hospedeiro vertebrado (Figura 2). No ciclo da leishmaniose visceral o homem e o cão são considerados hospedeiros urbanos. Apesar dos diversos reservatórios silvestres, o cão merece destaque não apenas pela proximidade com o homem, mas por desenvolver a forma grave da doença (ASSCHE *et al.*, 2011).

Figura 2 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp. em mamíferos e flebotomíneos

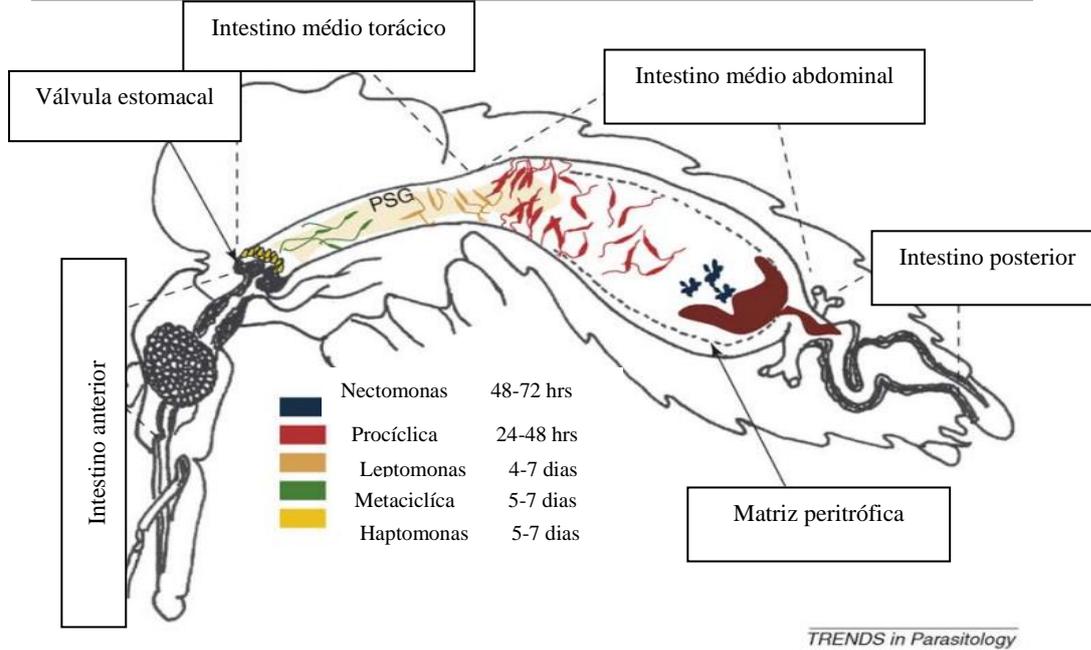


Fonte: Frézard (2015)

O ciclo de vida de *Leishmania* no vertebrado tem início quando as fêmeas de flebotomos fazem seu repasto sanguíneo e regurgitam as formas promastigotas de *Leishmania* spp., inoculando-as na pele, onde são imediatamente capturadas pelas células fagocíticas e interiorizadas em vacúolo intracitoplasmático rodeado por uma membrana fagossomal, que se unem aos lisossomos originando o fagolisossoma dentro dos macrófagos e das células dendríticas circulantes. Aproximadamente 24h após a inoculação, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, ainda dentro do fagolisossoma do macrófago onde se dividem (ASSCHE *et al.*, 2011).

A fêmea de flebotomíneo se infecta ao realizar a hematofagia no hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo amastigotas presentes nas células do sistema monocítico fagocitário (SMF). As amastigotas chegam até o intestino do inseto onde se diferenciam. Inicialmente as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas, forma parasitária lenta de flagelo curto. A forma promastigota procíclica se multiplica no intestino médio perfazendo o primeiro ciclo. Após a ação digestiva, só algumas promastigotas conseguem resistir a ação enzimática e então se diferenciam em nectomonas (forma evolutiva grande e delgada) a fim de fugir da matriz peritrófica e migrar para as células epiteliais do intestino médio. No intestino ocorre outra diferenciação em leptomonas (forma mais curta do parasita) dando início ao segundo ciclo de multiplicação. Então, ocorre os dois estágios na válvula estomacal, onde são observadas as haptomonas e as promastigotas metacíclicas (KAMHAWI, 2006) ocorrendo a metaciclo gênese (ASSCHE *et al.*, 2011).

Figura 3 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp. em um vetor competente: Tempo *versus* formas evolutivas



Fonte: Adaptado de Kamhawi (2006)

2.4 Leishmaniose no Brasil

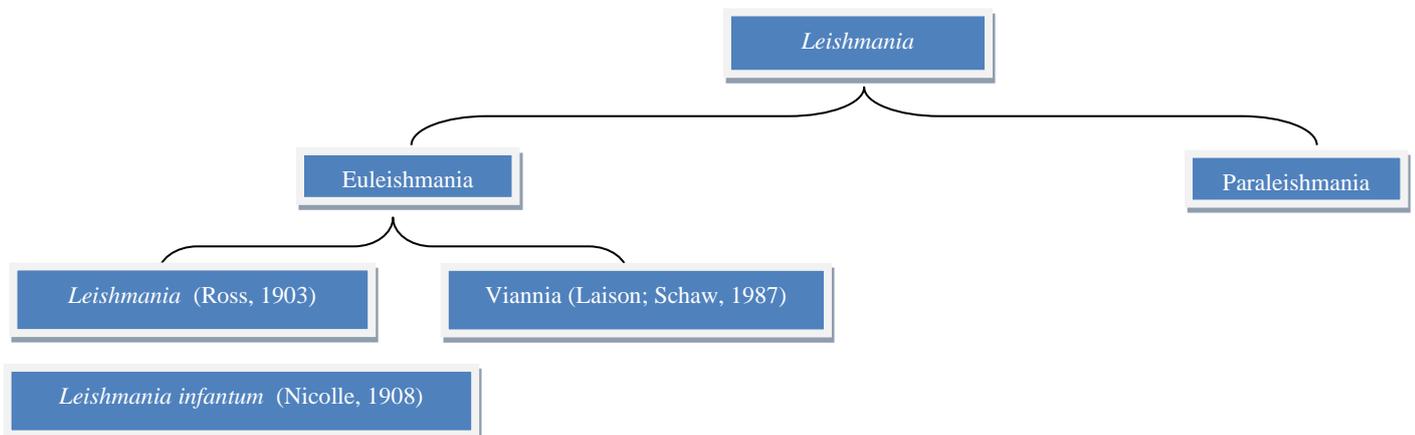
Os primeiros registros da leishmaniose visceral (LV) no Brasil são de Carlos Chagas em 1911 em pacientes com esplenomegalia. Contudo, foi Migone quem identificou o parasita em pacientes no Estado do Mato Grosso do Sul por volta de 1912-1913. O primeiro diagnóstico foi feito pela identificação de amastigotas no fígado de pacientes que vieram a óbito por febre amarela (GONTIJO; MELO 2004). Já o primeiro diagnóstico *in vivo* foi realizado por Evandro

Chagas através da punção esplênica durante um surto na Argentina, foi quando classificou uma nova espécie, a *Leishmania chagasi* em 1936 (GONTIJO; MELO 2004).

Contudo, apenas em 1937 é que a espécie foi descrita e incriminada como agente etiológico da LV nas Américas por Cunha e Chagas. Tempos depois foi retificado por Cunha admitindo que *L. infantum*, descoberta em 1908 por Nicolle, e *L. chagasi* são a mesma espécie. Foram sugeridas, ainda, nomenclaturas que incluíam *L. chagasi* como subespécie (*Leishmania infantum chagasi*) outros como sendo sinônimos. Entretanto, o autor entende que mesmo a sugestão de subespécie ser algo mais plausível, as implicações de reclassificação o fazem sugerir a sinonímia até a reclassificação *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) (DANTAS-TORRES, 2006a).

A situação de sinonímia foi ratificada, em uma tabela simplificada baseada em eletroforese enzimática multilocus, que inclui na secção Euleishmania os subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* e *L. (Sauroleishmania)*. Sendo *Leishmania infantum* (velho mundo) sinonímia de *L. chagasi* (novo mundo) pertencentes ao subgênero *L. (Leishmania)* complexo *L. donovani* (SCHONIAN; MAURICIO; CUPOLILLO, 2010). Essa proposta de classificação foi ratificada por Akhoundi *et al.* (2016) (Figura 4).

Figura 4 - Classificação da *Leishmania infantum*



Fonte: Adaptada de Akhoundi *et al.* (2016)

2.5 Epidemiologia

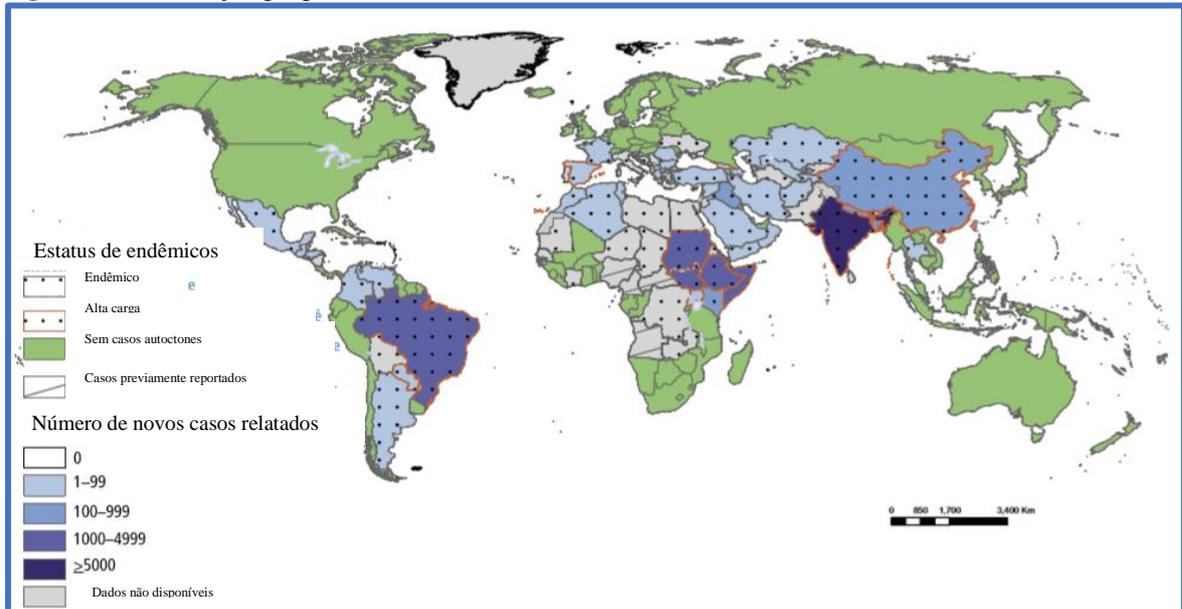
As leishmanioses inicialmente são zoonoses, contudo quando ocorre a inclusão do homem no ciclo é então considerada uma antropozoonose (BRASIL, 2014). A forma visceral é a mais grave e quando não tratada pode levar à morte (NOGUEIRA *et al.*, 2018), sendo a incidência e letalidade maior em indivíduos não tratados, crianças desnutridas, e emergente em

indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Considerada uma das doenças mais importantes da atualidade em franca expansão com um crescente número de vetores e reservatórios (FERROGLIO *et al.*, 2018).

2.5.1 Distribuição geográfica da leishmaniose visceral

As leishmanioses estão distribuídas em mais de 98 países que incluem os trópicos, subtropicais e bacia mediterrânea, com aproximadamente 12 milhões de infectados, 350 milhões de pessoas em situação de risco de infecção e estimado que 2,5 milhões de cães estejam infectados apenas na bacia do mediterrâneo (AKHOUNDI *et al.*, 2016). A evolução da doença no Brasil foi rápida e progressiva. Em 2013, o país detinha 90% dos casos de LV com subnotificação (MARCONDES; ROSSI, 2013). Atualmente o Brasil é destaque com 14% de focos ecoepidemiológicos e junto com mais 2 países representam 73% dos casos registrados no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DO SAÚDE, 2017) (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição geográfica dos novos casos de leishmaniose visceral em 2015



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2017)

Estudos mostram que a Região Nordeste é endêmica para LV e LVC apresentando alta frequência da doença (SILVA *et al.*, 2016). O estado de Alagoas, situado na Região Nordeste, apresenta uma alta incidência da doença com 55 casos nos primeiros 5 meses de 2018, sendo 28 confirmados. Foi registrado o óbito de 6 pessoas no mesmo período, colocando Alagoas em estado de alerta (ALAGOAS, 2018).

2.5.2 Reservatórios

Leishmania spp. é transmitida na sua forma flagelar por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo a uma gama de hospedeiros domésticos e silvestres como os canídeos domésticos (*Canis lupus familiaris*) e silvestres (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*), roedores (*Roedontia*), marsupiais (*Didelphis albiventris*), morcegos (*Chiroptera*), furões (*Mustela*) e gato doméstico (*Felis catus*) (AKHOUNDI *et al.*, 2017; BRASIL, 2014). Um estudo no Sudoeste da Espanha mostrou uma prevalência de *Leishmania* spp. de até 100% em espécies silvestres (RISUEÑO *et al.*, 2018).

Existem, ainda, relatos de *Leishmania* spp. parasitando morcegos das espécies *Platyrrhinus incarum*, *Phyllostomus discolor*, *Platyrrhinus lineatus*, *Artibeus planirostris* e *Artibeus lituratus* capturados em áreas urbanas de Campo Grande - MS (REZENDE *et al.*, 2017).

Apesar da variedade de reservatórios o cão continua sendo o principal reservatório urbano. Em um estudo feito em Alagoas, no período de 2007 a 2013 observou-se uma incidência de LVC de 9%. Tendo sido feita a triagem 45.112 cães e destes 4.466 foram positivos (ROCHA *et al.*, 2018). Em Pernambuco os números variam, com valores de 2,5% no Estado, entretanto com valores de 25% em Itamaracá na região Metropolitana do Recife (DANTAS-TORRES, 2006b). Estudos no Maranhão, região Nordeste do país mostraram um percentual de 24,96% (564/ 2.259) de cães soropositivos no período de 2009 a 2012 com maior número de casos registrados em períodos secos (SALES *et al.*, 2017).

2.6 Patogenia da leishmaniose visceral canina

A pele é o primeiro órgão a ser parasitado por *Leishmania infantum* no cão, levando a degradação da matriz extracelular (MEC) e uma resposta inflamatória que provoca lesões dermatológicas e nodulares, dermatite alopecica, descamação, dermatose ulcerativa (JACINTHO *et al.*, 2018).

A inefetividade do sistema imune em eliminar o parasita permite que ele se multiplique e se dissemine para os órgãos (SILVA; WINK, 2018) através dos macrófagos chegando ao fígado, baço, medula óssea (BRODSKYN; KAMHAWI, 2018), linfonodos, trato gastrointestinal e pele que são órgãos ricos em macrófagos, plasmócitos e linfócitos provocando infiltrados celulares levando a reação inflamatória (MELO *et al.*, 2009). O baço sofre ação do parasita, levando a imunossupressão dos linfócitos TCD4+, provocando um desarranjo na polpa

branca esplênica e redução dos folículos linfoides. A redução no número de células T CD4⁺ e o aumento da carga parasitária de *L. infantum* provoca alterações morfofisiológicas nos cães infectados (SILVA *et al.*, 2018), levando ao processo degenerativo com fibrogênese e deposição de fibras colágenas intensa oriunda do parasitismo tecidual (MARTINS *et al.*, 2015).

No fígado, os parasitas usam glicoproteínas como fibronectina (FN), laminina (LN) tenascina (TN) para se associar aos monócitos e macrófagos do hospedeiro, presentes na matriz extracelular (ECM) que ainda é composta por colágeno e elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e proteínas estruturais, as quais irão influenciar na rigidez do órgão resultando na disfunção hepática levando a fibrose hepática e cirrose (MELO *et al.*, 2009).

Após a infecção na pele, as células infectadas migram primeiramente para os linfonodos (COSTA *et al.*, 2018). A migração para os linfonodos provoca aumento dos folículos linfoides, hiperplasia capsular, hipertrofia e hiperplasia das células linfoides, levando a degradação da matriz celular e destruição estrutural e morfológica (KONODO *et al.*, 2009).

No intestino, as lesões estão associadas a alta carga parasitária com infiltrado de células mononucleares (linfócitos T CD8⁺ e macrófagos) causando inflamação crônica levando a quadros de colites e diarreia sanguinolenta causada por lesões ulcerativas na mucosa intestinal (SILVA, *et al.*, 2017).

2.7 Imunopatogenia da leishmaniose visceral canina

No momento do repasto sanguíneo pelas fêmeas de flebotomíneos, o protozoário é inoculado juntamente com a saliva composta por fatores anticoagulantes e vasodilatadores (maxidilan) que facilitam o fluxo sanguíneo e fatores imunomoduladores que além de inibir a cicatrização de feridas, também suprimem a resposta imune, e conseqüentemente contribuiu para o estabelecimento da infecção (WHEAT *et al.*, 2008; SECUNDINO *et al.*, 2012). Após a inoculação de promastigotas de *Leishmania* spp. na derme, o sistema imunológico da pele é ativado com a presença do sistema complemento, células de Langerhans, neutrófilos, fibroblastos e queratinócitos, macrófagos e células dendríticas (PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015).

Entretanto, as substâncias presentes na saliva do vetor, especialmente o maxidilan, peptídeo que tem efeito imunomodulador, pode desviar a resposta Th1 para Th2, provocando resposta inflamatória mínima e desta forma permitindo a entrada do parasita no hospedeiro (AIRES *et al.*, 2005). O maxidilan atua por meio do receptor tipo I do peptídeo hipofisário ativador do AMP cíclico. Sendo um regulador da expressão do gene do óxido nítrico-sintase

induzível (iNOS), reduzindo a produção do óxido nítrico (NO) em macrófagos através da inibição da fosfatase, facilitando a proliferação do parasita (WAITUMBI; WARBURG, 1998). Assim, as células dendríticas (DCs) promovem a secreção de citocinas tipo 2 (IL-6 e IL-10), reduzindo a produção de citocinas tipo 1 (IL-12p40, TNF-alfa e IFN-gama) por DCs estimuladas (WHEAT *et al.*, 2008).

A incapacidade do macrófago em matar a *Leishmania* spp. no cão infectado gera mecanismos compensatórios (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). Na pele, regulação positiva é atribuída a TLR9 e FoxP3 no início da infecção. Depois o poder de regulação diminui podendo até ficar negativa na transcrição de TLRs, Th17 e FoxP3, sendo neste caso indicativas de estabelecimento da infecção por *Leishmania infantum* (HOSEIN *et al.*, 2015).

Após a interiorização das formas promastigotas de *L. infantum*, as células sentinelas, irão promover a ativação da resposta imunitária. A interação do padrão molecular associado a patógenos (PAMPs) com os receptores do tipo Toll-Like (TLRs) das células sentinelas desencadeará a ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear κ de células β (NF- κ β) e fator nuclear T de células ativadas (NF-AT), que estão envolvidos na ativação de genes que codificam citocinas, TNF- α , IL-1 e IL-12, quimiocinas, e o iNOs (FREITAS; PINHEIRO, 2010).

2.8 Resposta humoral e celular

A leishmaniose visceral é uma doença imunomediada que diminui a capacidade imunoproliferativa dos linfócitos CD4+ contra os antígenos de *L. infantum*. Os sintomas da doença podem variar conforme a produção de citocinas e o tipo de resposta imune do hospedeiro e a presença do parasita. Cães assintomáticos desenvolvem predominantemente a resposta do tipo Th1 com produção das citocinas IL-12, IFN- γ TNF- α , e em cães sintomáticos predomina a resposta Th2 (IL-4, IL-10 e TGF- β) (TONIN *et al.*, 2016). Assim, animais suscetíveis apresentam uma resposta imune humoral e celular branda contra o parasita, culminando com o surgimento dos sinais clínicos. Tendo a expressão das citocinas citadas um papel importante quanto à progressão ou resistência a doença (SILVA *et al.*, 2018).

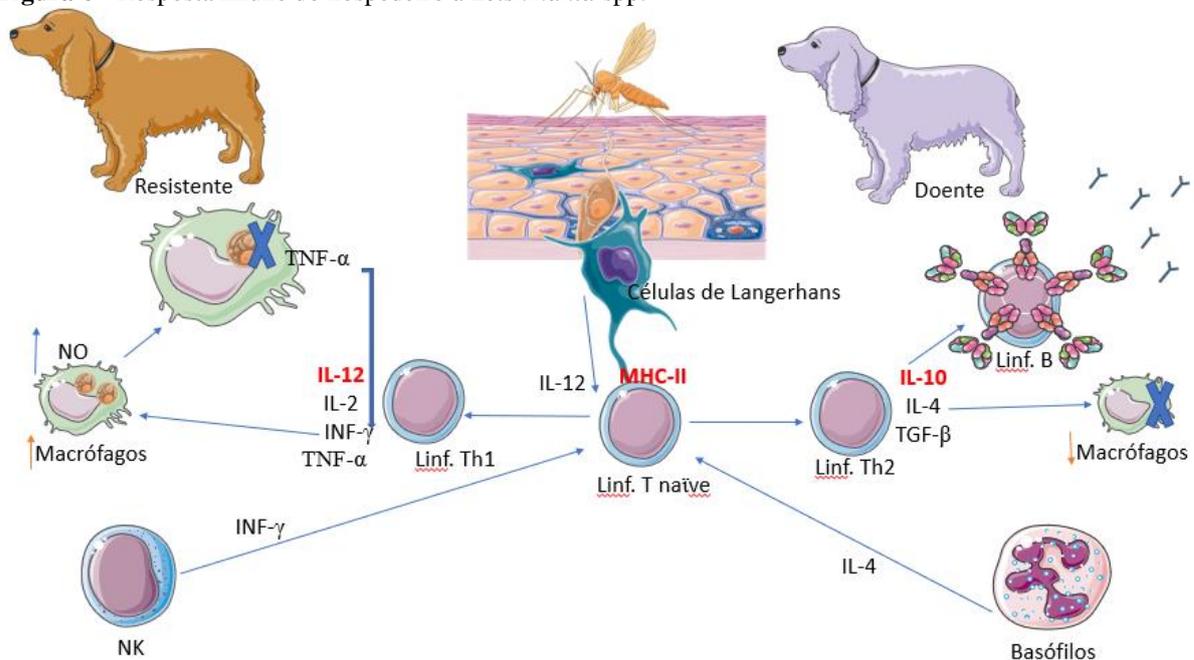
A ação imunomoduladora que atua na inibição da IL-10 e aumenta a produção das IL-2 e IFN- γ tem sido o alvo de estudos experimentais (SOUZA; LIMA, 2018). Sendo o IFN- γ uma importante citocina para defesa contra patógenos por atuar nas diferentes respostas imunológicas (inata e adaptativa) e por induzir a síntese de óxido nítrico pelos macrófagos. Já

a IL-10 tem sido estudada por suprimir a resposta imune protetora, estando, portanto, relacionada a progressão da doença (ROSÁRIO *et al.*, 2018).

Estudos relatados, em cães, descrevem a participação dessas células, citocinas e imunoglobulinas produzidas durante a infecção de cães com *L. infantum* (Figura 6).

A IL-10 pode inibir a resposta protetora levando à progressão da doença. Tal fato, é demonstrado em estudo realizado em cães, o qual conseguiu relacionar essa citocina ao aumento da parasitemia através da crescente expressão do parasita dentro das células e aumento da liberação de IL-10 por macrófagos e células T.

Figura 6 - Resposta imune do hospedeiro à *Leishmania* spp.



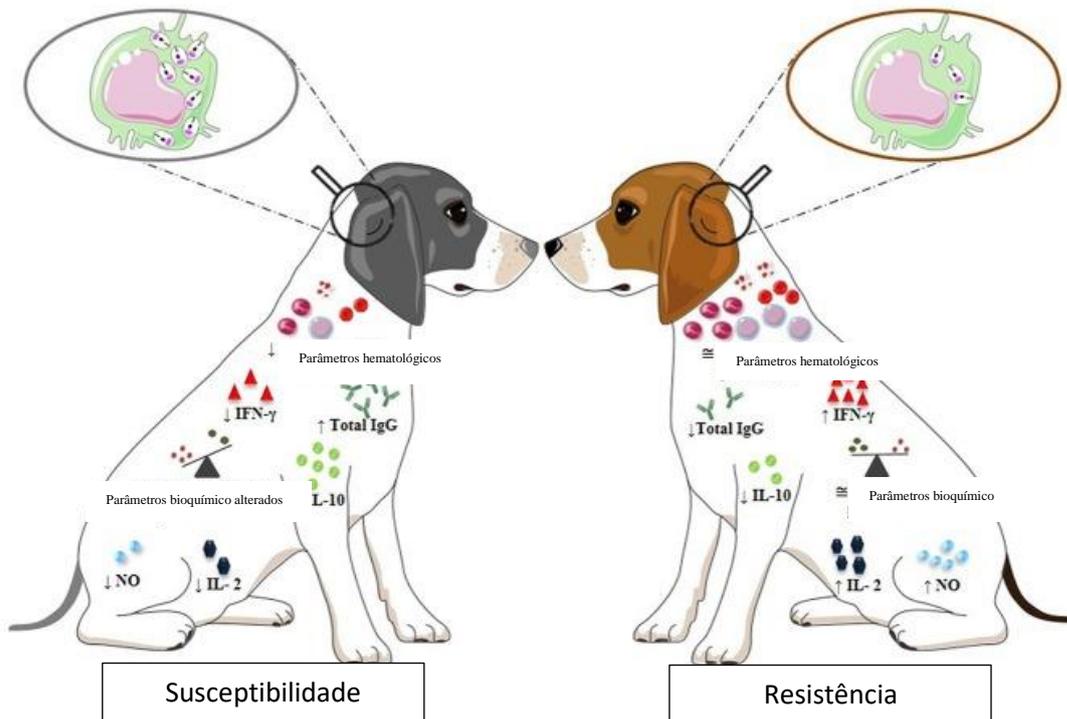
Fonte: A autora, baseado em Pereira (2013)

Nota: A fêmea de *Lutzomyia* durante o repasto sanguíneo inocula as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* spp. na derme. O sistema imunológico da pele é ativado com a presença do sistema complemento, células de Langerhans, neutrófilos, basófilos, fibroblastos e queratinócitos, macrófagos e células dendríticas. As promastigotas são fagocitadas por células do sistema monocítico fagocitário (SMF) que promovem a secreção de citocinas tipo 2 (IL-10), reduzindo a produção de citocinas tipo 1 (IL-12, TNF-alfa e IFN-gama) e a apresentação das moléculas de MHC II, que juntamente com a IL-4, produzida pelo eosinófilo, estabelece a resposta Th-2. pela diferenciação dos Linfócitos T naïve em Linfócitos Th2 com a secreção de IL-10, IL-4, TGF-β, ativação dos linfócitos B e diferenciação em plasmócitos com produção de IgG e IgE, levando a progressão da doença. Por outro lado, após a fagocitose o antígeno é apresentado aos linfócitos T naïve através da molécula de histocompatibilidade de classe II (MHC-II). As células virgens (células T naïve) sofrem ação de das citocinas: IL-12 (liberadas por células natural killer – NK e células do SMF) diferenciando-as em células Th1. A Th1 secreta citocinas: IL-12, IL-2, IFN-γ e TGF-β que recrutam os macrófagos e estimulam através de vias de sinalização a produzirem o oxido nítrico (ON) que leva a morte das formas amastigotas dentro do macrófago. Os macrófagos também liberam o TNF-α que estimula a citocina IFN-γ a agir nos macrófagos por meio das vias de sinalização. Levando a resistência.

A IL-10 inibe as células apresentadoras de antígeno (dendríticas e macrófagos) e consequentemente a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade

(MHC) de classe II e moléculas coestimuladoras, além de inibir a produção de IL-12, o que reflete na diminuição da resposta Th1 e consequentemente redução de IFN- γ (ROSÁRIO *et al.*, 2018) levando a susceptibilidade (Figura 7). Visto que, a IL-12 é a principal responsável pela transformação dos linfócitos T *naïve* em Th1, além disso, estimula a produção das células TCD4+ (SILVA, 2018).

Figura 7 - Biomarcadores e parâmetros hematológicos e bioquímicos geralmente presentes em cães susceptíveis e resistentes a infecção por *L. infantum*.



Fonte: Gonçalves *et al* (2019).

Nota: As células T tem papel fundamental na susceptibilidade ou resistência à doença, visto que as células T CD8+ e T CD4+, compõem um subconjunto de células efetoras citolíticas diferentes denominadas T citotóxicos 1 (Tc1) e citotóxicos T 2 (Tc2), as quais produzem IL-2 e IFN- γ e IL-4, IL-5 e IL-10 respectivamente, de forma a modular a resposta Th1 e Th2 (SILVA *et al.*, 2017). A susceptibilidade ou resistência pode ser relacionada a biomarcadores da LVC como demonstrado no esquema proposto por Gonçalves *et al* (2019). As setas (\uparrow e \downarrow) indicam o aumento e a diminuição nos níveis dos biomarcadores, respectivamente; \cong : níveis normais aproximados; \downarrow Parâmetros hematológicos: diminuição dos glóbulos vermelhos, linfócitos, eosinófilos e plaquetas; Parâmetros bioquímicos alterados: hiperproteinemia, hipoalbuminemia, aumento dos níveis de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, ureia e creatinina Gonçalves *et al* (2019).

Análises em cães naturalmente infectados colocam as células dendríticas (CDs) como essenciais na transição entre a imunidade inata e adaptativa. Após estudo feito com células dendríticas obtidas de monócito de sangue periférico infectados com *L. braziliensis* e *L. infantum* observou-se que ambos os parasitas induziram a expressão de CD86 quando as DCs foram infectadas por 24 h. Por outro lado, detectou-se uma menor expressão de superfície de CD209 na presença de *L. braziliensis* e *L. infantum*, mas apenas a última promoveu a sobrevivência de DCs após 24 h. Portanto, as DCs infectadas por ambas as espécies de

Leishmania apresentaram maior expressão de CD86 e uma diminuição da expressão de CD209 (FALCÃO *et al.*, 2016).

A susceptibilidade da doença vem em consequência do aumento da IL-4 direcionando a resposta imune para o perfil Th2, o que aumenta a produção de IL-10, TGF- β e prostaglandina E₂ que inibem os macrófagos e estimulam a diferenciação dos plasmócitos em células B e produção de anticorpos IgG1 e IgG2. As taxas de infecção estão diretamente ligadas à apresentação de antígeno as células T desenvolvendo a doença. Outro fator que contribui para progressão da doença é o LPG (lipofosfoglicano) presente na membrana do parasita, inibindo as enzimas lisossomais e hidrolítica do macrófago, resultando em uma resposta humoral exacerbada (LARANJEIRA, 2008). Estudos mostram que a marcação de células B e monócitos são importante nos sinais clínicos da LVC. Cães sintomáticos apresentam alta parasitemia e aumento das imunoglobulinas IgG, IgG2, IgM, IgA e IgE. Enquanto, cães assintomáticos estão associados à baixa parasitemia e produção de IgG1 (REIS *et al.*, 2009).

Entretanto, deve-se ressaltar que a resposta pode ser diferente em cada indivíduo, visto que cada um é geneticamente distinto, e o curso da doença determinado pela resposta imune inata e adaptativa de cada hospedeiro. Assim o fenótipo resistente ou protetor está relacionado a autocura ou indivíduos assintomático corresponde a resposta regulada por células Th1 e a resposta imune humoral pela resposta Th2, a qual está associada a doença sintomática grave e a produção elevada de IgG1 e IgE (DAY, 2007). Quanto a diversidade de imunoglobulinas e os resultados conflitantes quanto a subclasse de IgG envolvida estão relacionadas à especificidade dos anti-soros policlonais utilizadas para diagnóstico e disponíveis comercialmente e são capazes de detectar tanto IgG1 quanto IgG2. Tal situação pode ser resolvida por meio da disponibilidade de anticorpos monoclonais com especificidade bem validada para todas as quatro subclasses de IgG canina (DAY, 2007).

2.9 Sinais clínicos da LVC

O resultado da infecção e as manifestações clínicas é uma consequência de intrincadas interações entre o protozoário e os antecedentes imunológicos e genéticos do hospedeiro podendo variar, conforme a interação de subclínica a doença muito grave (MAIA; CAMPELO, 2020). Hospedeiros com sinais subclínicos ou assintomáticos mantêm o ciclo de transmissão da LVC de forma silenciosa, especialmente em áreas endêmicas. A população de cães assintomáticos torna-se, portanto, um problema no controle da LVC. Entendendo, ainda, que os sinais clínicos da LVC podem variar de acordo com a espécie de vetor, o hospedeiro e o

parasita (AKHOUNDI *et al.*, 2017). A variedade de sinais torna necessário um exame detalhado tanto clínico quanto laboratorial. Destacando a importância da titulação dos testes sorológicos e da função renal, bem o diagnóstico epidemiológico. Entretanto, estes resultados tem levado a formação de diferentes classificações clínicas (SANTOS *et al.*, 2019).

Diante da diversidade e inespecificidade de sinais clínicos da leishmaniose canina (SILVA; WINCK, 2018) a “*Canine Leishmaniasis Working Group*” (CLWG) resolveu classificar a LVC nos seguintes grupos: cães expostos, infectados, cães doentes, cães severamente doentes (PALTRINIERI *et al.*, 2010).

Os sinais mais frequentes são: caquexia, onicogribose, dermatite, úlcera de pele, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia (LIMA *et al.*, 2017) e oftalmopatias (OLIVEIRA; ALVES; SILVA-JUNIOR, 2012). Nos casos raros, ou menos frequentes estão as infecções no sistema reprodutor de machos e fêmeas (OLIVEIRA; ALVES; SILVA-JUNIOR, 2012), no sistema urinário (BLAVIER *et al.*, 2001), além das cardiopatias e pneumopatias (TORRENT *et al.*, 2005). Entretanto, podem existir casos de leishmaniose visceral, onde o cão com hipoadrenocorticismo e infectado por *L. infantum* pode apresentar telangiectasia, atrofia cutânea chamada também de pele pregueável ou papiriforme, rarefação pilosa restrita a região sacral, comedões, periodontite, nódulos, no terço médio da face lateral direita da língua, placa localizada entre a face ventral da língua e o assoalho bucal. Os nódulos apresentam epitélio ulcerado, tecido de granulação, infiltrado por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, e grande quantidade de amastigotas de *Leishmania* spp. (BOCHNAKIAN *et al.*, 2018).

Outros sinais atípicos estão relacionados ao sistema nervo central, onde podem ser observados: andar em círculos, convulsões, paresia, tetraplegia, inclinação de cabeça, incoordenação motora, tremor intencional, nistagmo, estrabismo, mioclonia, encefalite, meningite e coroidite (GRANO *et al.*, 2018). Também foi observado lesões no aparelho reprodutor de machos e fêmeas. Nas cadelas as lesões podem estar presentes na vulva e vagina. Os machos parecem ser mais afetados com lesões presentes nos testículos, epidídimo, glândula e prepúcio, além da presença de *Leishmania* spp. no sêmen (OLIVEIRA; ALVES; SILVA-JUNIOR, 2012).

2.10 Diagnóstico da LVC

O diagnóstico dos cães parasitados é essencial para controle da leishmaniose. Mas existem vários entraves para o diagnóstico como: as áreas de difícil acesso, testes sorológicos que possibilitam resultados falso-negativos, exames sofisticados que necessitam de

equipamento, insumos caros, pessoal treinado e testes invasivos que inviabiliza a coleta à campo.

No Brasil os testes utilizados para diagnóstico da LVC são o DPP e o ELISA (BRASIL, 2017). O ensaio imunocromatográfico rápido (TRI) Dual Plate Platform (DPP), usa a tecnologia Dipstick e a proteína recombinante rK28 que possibilita detectar anticorpos contra os antígenos de proteína recombinante K9/K26/K39 considerados antígenos específicos de *L. infantum* (GRIMALDI-Jr *et al.*, 2017). O ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) utilizado para diagnóstico da LVC usa para detecção de anticorpos contra *L. infantum* o antígeno preparado a partir do lisado bruto de parasitas total semelhantes de *L. major* -like com sensibilidade de 93,2% (IC 95%: 85,1-97,1%) e a especificidade 100,0% (IC 95%: 94,6-100,0%) em cães sintomáticos (FUJIMORI *et al.* 2021).

Entretanto, estudos que utilizam a rK39, uma proteína recombinante e imunodominante da família Kinesina (proteínas motoras que se movem em microtúbulos), confere a esta proteína, uma alta especificidade e sensibilidade. A presença deste epítipo está bem conservado na *Leishmania* spp. (LEMOS *et al.*, 2003) e vem sendo testado para utilização da LVC com resultados superiores aos utilizados atualmente, com sensibilidade em torno de 97% e a especificidade de 100%. (FUJIMORI *et al.* 2021).

Estão disponíveis no mercado outros TRIs que detectam imunoglobulina G (IgG) e que se ligam à proteína recombinante rK39 também derivada do complexo *L. donovani* como o teste rápido da marca Alere que tem similaridade ao DPP, visto que é composto pela mesma proteína recombinante K28 (rK9/rK26/rK39) com capacidade também de detectar anticorpos contra esses antígenos em amostras de sangue, soro ou plasma (MARCELINO; SOUZA-FILHO, 2015). Sendo considerado positivo cães que apresentarem anticorpos circulantes contra os antígenos de proteínas recombinantes K9, K26 e K39 (GRIMALDI-Jr. *et al.*, 2017).

O Teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) utilizando diluição de 1/40 era utilizado como confirmatório, contudo, foi substituído em 2011 pelo DPP, devido a questões de reprodutibilidade e acurácia, as quais eram inferiores ao DPP e ao ELISA (BRASIL, 2011). A procura direta do parasita no exame parasitológico, através de aspirados de medula, e/ou biópsia de pele, é o padrão ouro para diagnóstico de LVC, no entanto é uma técnica invasiva. Além disso, os aspectos clínico-epidemiológicos são importantes no diagnóstico da LVC (BRASIL, 2017).

O diagnóstico seguro é a chave para epidemiologia molecular e o tratamento direcionado (AKHOUNDI *et al.*, 2017). Neste sentido, a biologia molecular mostra ser uma excelente ferramenta de diagnóstico, pois possui capacidade de detectar até 0,001 e 0,1

parasita/reação, com especificidade que pode variar de 95 a 100% dependendo do método molecular e tipo de amostra biológica utilizada, bem como a classificação clínica em que o animal se encontra. Cães sintomáticos possuem uma carga parasitária maior, sendo mais facilmente detectado tanto em amostras de sangue quanto de medula, apesar disto é possível verificar uma maior quantidade de parasitos em amostras de medula. Entretanto, cães assintomáticos são mais facilmente detectados quando são utilizadas amostras de medula e linfonodo do que de sangue, e utilizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) do que a reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR). Sendo, a qPCR a ferramenta molecular mais indicada independente da fase clínica ou do material utilizado (TRAVI *et al.*, 2018).

Existem ainda outros dispositivos moleculares menos laboriosos e mais sensíveis do que os métodos sorológicos, para amplificação do DNA em isoterma e uso da polimerase (TRAVI *et al.*, 2018). A amplificação da polimerase recombinase isotérmica (RPA) foi acoplado a leitura de fluxo lateral (LF) (RPA-LF) e adaptado para detecção de DNA de *L. infantum*. O teste foi comparado a qPCR obtendo resultados semelhantes e capaz de detectar o DNA de 0,1 parasita o que equivale a 40 parasitas por mL de sangue de cão infectado. O teste ainda foi capaz de detectar mais cães em condições subclínicas ou assintomáticos mais do que testes de fita utilizando o antígeno recombinante rK39 (CASTELLANOS-GONZALEZ *et al.*, 2015). Estudos utilizando a amplificação isotérmica mediada por *Loop* (LAMP) foi comparado às técnicas de PCR, ELISA e microscopia em 144 amostras de *swab* conjuntival de cães assintomáticos infectados por *L. infantum*. Os autores concluíram que o LAMP foi mais sensível e específico que as outras técnicas, sendo capaz de detectar 1f de DNA de *L. infantum* e especificidade 97% (CHUN-HUA *et al.*, 2015).

2. 11 Diagnóstico complementar da LVC

O diagnóstico complementar utilizado com maior frequência como método complementar é o hemograma. Sendo de grande valia alterações frequentes coma a anemia que pode estar associada a presença do parasita na medula levando a aplasia medular e consequente anemia arregenerativa (SILVA; WINCK, 2018). Tais alterações são considerados bons biomarcadores preditivos da LVC (MAIA; CAMPINO, 2020). Pode ser observada, ainda, trombocitopenia, linfopenia oriunda do sequestro dessas células para o baço e linfonodo, além da destruição das células com aumento compensatório dos monócitos (SILVA; WINCK, 2018).

Exames bioquímicos podem auxiliar fornecendo dados sobre o nível de comprometimento hepático e renal, porém sem ter valor preponderante para o diagnóstico de *L. infantum*. Pode ajudar ainda na avaliação do estado clínico do animal, da melhora terapêutica e no seu prognóstico. Estudos mostram diferenças significativas entre cães sintomáticos e assintomáticos apenas com relação a concentração de ureia, onde cães sintomáticos apresentam valores maiores. Contudo, tal observação entre grupos não foi visibilizada quando avaliados: proteínas totais, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e triglicérides (VIEIRA-NETO *et al.*, 2011).

Exames de imagens são importantes para a visualização de alterações nos órgãos acometidos pela leishmaniose, a ultrassom com *Doppler* é uma boa ferramenta na detecção precoce das alterações hepáticas em cães, podendo acompanhar o curso da doença, porém sem caracterizar lesões específicas, podendo-se observar: a ecogenicidade do fígado diminuída em pouco mais da metade dos casos, alterações dos vasos hepáticos em três quartos dos animais acometidos, velocidade do fluxo sanguíneo da veia porta aumentada (OLIVEIRA, 2015).

2.12 Controle da leishmaniose visceral

As medidas de controle estão direcionadas ao diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos; assistência de qualidade ao paciente humano; controle químico do vetor; eutanásia dos cães infectados; orientação à população; e recomendações específicas para áreas com a presença da doença e áreas sem relatos de leishmaniose visceral (BRASIL, 2014).

É importante ressaltar que o tratamento de cães com soropositivos para LVC não é considerada uma medida de controle da LV e da LVC no âmbito da saúde pública. Assim, o tratamento é uma decisão única do tutor do animal (SANTA CATARINA, 2018).

Dentre as medidas citadas de controle para LV adotadas no Brasil, destaca-se o diagnóstico de cães sorologicamente positivos e a eutanásia desses animais a fim de cumprir um dos objetivos da vigilância epidemiológica que é reduzir as fontes de infecção dos vetores. Apesar de esta medida ser pouco efetiva quando utilizada isoladamente (BRASIL, 2017).

2.13 Profilaxia da leishmaniose visceral canina

Animais negativos aos testes recomenda-se o uso de coleiras repelentes impregnadas com deltametrina à 4% como medida preventiva individual (BRASIL, 2017). Apesar de um estudo recente ter resultados inconclusivos sobre o uso preventivo da coleira com deltametrina,

eles apontam para a possível eficácia desta medida profilática desde que realizada continuamente. Os autores ainda ressaltam a necessidade de ajuste das estratégias utilizadas atualmente e atenção aos desafios operacionais enfrentados pela gestão pública no controle das zoonoses (LEITE *et al.*, 2018).

Existiram algumas tentativas vacinais profiláticas, sendo a antepenúltima a vacina que utilizou o ligante de fucose manose (FML) e a proteína quimérica QuilA (leishmune) retirada do mercado brasileiro na terceira fase (BRASIL, 2014). Atualmente se encontra no Brasil a vacina com antígeno recombinante de A2 mais saponina denominada Leish-Tec (HERTAPE-CALIER-Brasil) comercializada no Brasil desde 2008 com bons resultados, visto que reduziu a população de cães infectados em área endêmica do sudoeste do Brasil dando a proteção induzida pela vacina, com uma evidente produção de anticorpos IgG anti-A2 específicos (GRIMALDI-Jr. *et al.*, 2017). Na Europa é comercializada a CaniLeish (VIRBAC-França) desenvolvida com A2 e fatores excretados e secretados de formas promastigotas *L. infantum* (LiESP) QA-21, sendo capaz de induzir um perfil imune dominado por Th1 apropriado, que persiste durante um ano inteiro (MORENO *et al.*, 2014).

2.14 Tratamento

Os fármacos atualmente utilizados não são capazes de desenvolver a cura estéril, isto porque o parasita consegue modificar os mecanismos imunológico do hospedeiro ou ainda explorar a célula hospedeira. Assim, estudos que realizem abordagens que associem a terapêutica com a imunologia e que esclareçam os mecanismos desenvolvidos pela relação parasito-hospedeiro prometem bons resultados e avanços nas pesquisas pré-clínica e clínica (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013). Alguns estudos com protocolos terapêuticos utilizados na LVC estão descritos abaixo.

2.14.1 Legalização do tratamento da LVC

Obedecendo a determinação emitida na Portaria Interministerial nº 1.426, foi autorizado pelo MAPA e pelo Ministério da Saúde o registro do Milteforan (miltefosina) da empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL, indicado para o tratamento da leishmaniose visceral de cães por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, ressaltando o cumprimento do protocolo de tratamento descrito na bula, contudo, com o bom senso diante da “...necessidade de reavaliação clínica, laboratorial e parasitológica periódica pelo médico veterinário, a

necessidade de realização de novo ciclo de tratamento, quanto indicado e a recomendação de utilização de produtos para repelência do flebotômíneo...”(BRASIL, 2016). Contudo, já existem estudos que falam sobre a resistência a miltefosina por *L. infantum* em humanos tratados na Índia, bem como uma mutação no transportador da miltefosina codificado pelos genes MT e ROS3 e ainda a resistência cruzada com a anfotericina B (MONDELAERS *et al.*, 2018).

2.14.2 Miltefosina

Hexadecilfosfocolina ou miltefosina é uma alquilfosfocolina de fórmula $C_{21}H_{46}NO_4P$ hexadecil 2- (trimetil azanium) fosfato de etila (hexadecilfosfocolina) (Figura 8), de atividade antineoplásica, ação leishmanicida e/ou imunomoduladora (BASTOS *et al.*, 2016).

Figura 8 - Molécula da Miltefosina

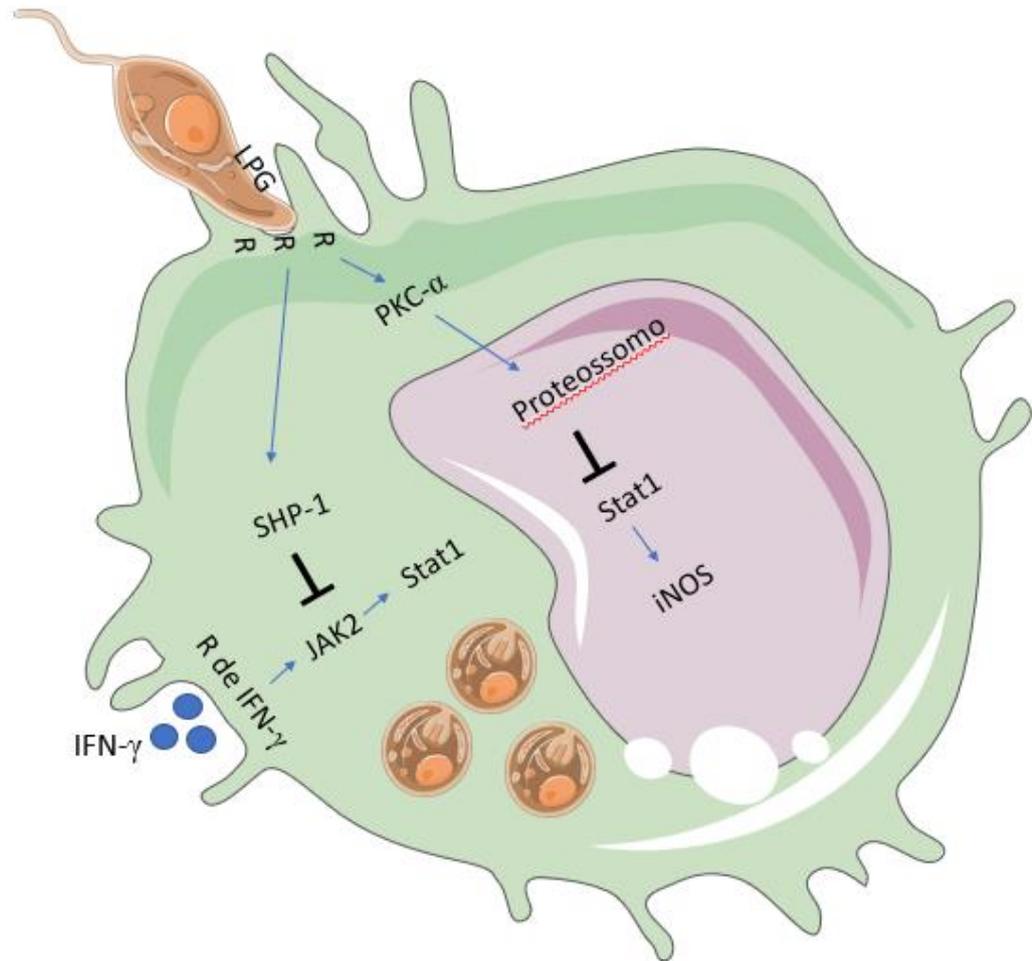


Fonte: Virbac saúde animal

Inicialmente foi utilizada na Índia em pacientes que tinham recidivas ao tratamento convencional com antimoniais, apresentando bons resultados, além da disponibilidade da administração oral com ótimos resultados *in vitro*. O fármaco tem ação inibitória na síntese de lipofosfoglicano (LPG) ilustrado na figura 9, glicoproteína 63 (gp63) e na enzima 1-acil-2-lisoglicero-3-fosfocolina aciltransferase em promastigotas. Além de ser citada a indução à apoptose e a ação imunomoduladora. Apesar das ações não comprovadas no âmbito terapêutico, a droga tem sido uma opção para pacientes imunocomprometidos (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Sendo o gene da gp63 um candidato adequado para estudar a sistemática molecular (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

A miltefosina é um análogo de fosfolípido similar aos compostos metabolizados pelo parasita, sendo capaz de penetrar na membrana e metabolizar os ésteres do parasita prejudicando a membrana e comunicação destes através da inibição da biossíntese de receptores GPI (glicosil fosfadil-inositol); interrupção do sinal de transdução da membrana por ativação da fosfolipase C, *Leishmania* específica, e da proteína quinase C causando a morte por apoptose da célula (VIRBAC, 2018).

Figura 9 - Interação do LPG com os receptores de membrana do macrófago e ação na via de sinalização do óxido nítrico



Fonte: A Autora adaptado de Olivier, Gregory e Forget (2005)

Nota: Vias de sinalização para ativação das funções dos macrófagos no momento da interação entre a *Leishmania* e o macrófago que leva a rápida ativação e desativação de várias vias de sinalização. A SHP-1 afeta negativamente as quinases JAK2, inibindo assim as funções de macrófagos induzíveis por IFN- γ para produção de óxido nítrico. A degradação de STAT1 α por proteossoma é dependente de PKC α . O LPG é fundamental na alteração do PKC, regulando funções fagocitárias importantes como a produção de NO responsável pela morte do parasito

Um mecanismo de ação direta da miltefosina no parasito provocando a morte (Figura 10) também é sugerida do por Palić *et al.* (2019).

permanência do parasito após o tratamento, apesar da redução significativa da carga parasitária observada nos estudos de Nogueira *et al.* (2018), Andrade *et al.* (2011), Manna *et al.* (2008)

2.14.2.3 Associação com outros fármacos

A associação mais utilizada é com alopurinol. Foi feito um estudo de dois ciclos. No primeiro ciclo foram utilizados 28 cães sintomáticos tratados com miltefosina (2 mg / kg / dia PO) em associação com alopurinol (10 mg / kg / dia, PO) por 30 dias. Foi observado que 50% (4/8) tiveram recaídas após 6 meses. Sendo iniciado o segundo ciclo de tratamento. Os animais foram monitorados quanto a carga parasitária a cada 3 meses por um período de 12 meses. Ao final 2 animais vieram a óbito. Foi observado que no primeiro ciclo de terapia com miltefosina e alopurinol houve uma grande redução da carga de *L. infantum* nos aspirados de linfonodos. Entretanto, não foi verificada a eliminação do parasita no segundo ciclo, e ainda foi visto alguns efeitos colaterais em 2 animais como vômito e alterações hematológicas (MANNA *et al.*, 2009). A associação tem mostrado bons resultados especialmente em cães doentes, visto que o tratamento com alopurinol pode inibir a reação inflamatória granulomatosa crônica e a fibrose hepática na LVC (CASTRO *et al.*, 2018).

Dias *et al.* (2020) mostraram em seus estudos por meio de exames clínico-patológicos, que a miltefosina associada ao alopurinol apresentam resultados melhores e mais eficazes do que a utilização da miltefosina administrada isoladamente, mesmo sendo a única droga permitida no Brasil para o tratamento da LVC.

2.14.3 Outros fármacos

O alto valor e toxicidade das medicações leishmanicidas no Brasil tem feito com que os médicos veterinários buscassem alternativas viáveis. Além dos vários registros de resistência a medicação, fez com que se tornasse urgente a identificação de novas medicações que apresentassem baixo custo e alta eficácia. Devido as dificuldades inerentes a descoberta e comercialização de novos fármacos é difícil o reposicionamento de medicamentos já existentes é uma alternativa (REIS *et al.*, 2021).

A domperidona (antiemético, inibidor da dopamina) tem sido usada no tratamento de cães com LVC com eficácia no controle e redução dos sinais clínicos e títulos de anticorpos, sendo verificado em 74,3% dos cães sintomáticos e obtida a soroconversão em 40% destes. Em cães com sintomatologia grave e altos títulos de anticorpos ocorreu melhora do quadro em 86%

dos animais com redução dos títulos de anticorpos em 38% destes cães observados nos testes cutâneos de *Leishmania* e um ensaio de proliferação de linfócitos (GOMÉZ-OCHOA *et al.*, 2009) tendo sido evidente, ainda, o seu estímulo à resposta imune mediada por células nos cães observados em associação ao aumento no percentual de fagócitos ativados durante e após o tratamento (GOMÉZ-OCHOA *et al.*, 2012).

A Ivermectina foi analisada *in vitro* e *in vivo* para verificar a sua ação leishmanicida contra *L. infantum*. Os resultados *in vitro* mostraram-se promissores com 50% de *Leishmania* e concentrações inibitórias de macrófagos (IC50 e CC50, respectivamente) de $3,64 \pm 0,48 \mu\text{M}$ e $427,50 \pm 17,60 \mu\text{M}$, respectivamente, com índice de seletividade (SI) de 117,45. A ivermectina mostrou ainda redução da carga parasitária dos macrófagos. Apresentou, ainda uma atividade profilática impedindo a infecção dos macrófagos, além de atuar diretamente nas mitocôndrias do parasito. Foram analisadas *In vivo* a ivermectina e a miltefosina em ratos e os resultados mostraram que os animais tratados com miltefosina, IVE e IVE / Mic apresentaram reduções significativas na carga parasitária em seus baços, fígados, medulas ósseas e linfonodos de drenagem, e indução a resposta imune Th1 de forma precoce. Os resultados fazem os autores sugerirem essa terapia como uma alternativa ao tratamento da leishmaniose (REIS *et al.* 2021).

3 JUSTIFICATIVA

O cão tem um papel de destaque no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral como importante reservatório (CASTELLANOS-GONZALEZ *et al.*, 2015). Estudos realizados no estado de Alagoas, especificamente no município de Marechal Deodoro têm mostrado um percentual de 18.84% (26/138) para *L. infantum* (OLIVEIRA *et al.*, 2017), chamando atenção tanto para o risco de infecção da população, bem como a provável morte ou eutanásia desses animais. O Estado de Alagoas publicou uma nota de alerta epidemiológico, com casos de leishmaniose visceral humana, registrados em quase todas as 10 regiões de saúde do Estado em maio de 2018. Foram notificados 239 casos entre 2014 e 2017 em 57 municípios. Em 2018 já foram 55 notificações em 20 municípios com 6 registros de óbitos (ALAGOAS, 2018) o que conseqüentemente recai no número de cães infectados que serão submetidos a eutanásia, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2017).

A complexidade da doença associada às espécies de *Leishmania* spp. torna a terapêutica desafiadora (HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGU, 2017), por isso é necessário ser elucidada, e conseqüentemente observar a melhora terapêutica (MANNA *et al.*, 2008), com ajuda da biotecnologia estimulando as imunoterapias e terapias vacinais (SOUZA; LIMA, 2018).

A miltefosina é o único medicamento oral liberado para o tratamento de cães com leishmaniose visceral no Brasil (BRASIL, 2016), apesar disto o seu mecanismo de ação ainda não está claro, existindo controversas entre autores (MOREIRA *et al.*, 2014). Além disso, é essencial que se consiga entender a clínica da LVC através de estudos imunológicos, histopatológicos e laboratoriais que tragam respostas para elucidar uma doença tão complexa e amplamente distribuída no mundo (VIEIRA NETO *et al.* 2011).

Diante disto, o presente estudo visa contribuir com sobre a ação da miltefosina nos diferentes estados clínicos considerados por Paltrinieri *et al.* (2010) e pela *Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG)* descrita por Paltrinieri *et al.* (2016) de forma a correlacionar a carga parasitária e a clínica com os resultados laboratoriais e ultrassonográficos. Ao final será possível prever sobre a capacidade o impacto da carga parasitária nos sinais clínicos e nas alterações morfológicas do fígado, baço e rins e a progressão da doença. Os resultados podem servir, ainda, como base de referência para novas pesquisas a fim direcionar novas formas de tratamento e controle.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Animais em tratamento para leishmaniose visceral canina com miltefosina 2% podem apresentar biomarcadores preditivos capazes de fornecer de forma precoce um diagnóstico evolutivo da doença?

5 HIPÓTESE

Com base nas análises da carga parasitária, os níveis de IgG e os biomarcadores hematológicos podem prever sobre a evolução da doença nos animais independente da fase clínica que o animal se encontre.

6 OBJETIVO GERAL

Predizer sobre a progressão da doença mediante análise da carga parasitária relacionada a evolução clínica, resultados sorológicos de anticorpos IgG, exames hematológicas, bioquímicas, ultrassonográficas e expressão gênica de citocinas do perfil Th1 e Th2 de cães infectados com *Leishmania infantum* submetidos ao tratamento com miltefosina.

6.1 Objetivos específicos

- a) Detectar anticorpos e monitorar os níveis de IgG anti-*Leishmania infantum* e o momento da soroconversão;
- b) Identificar e quantificar o DNA de *Leishmania infantum* no sangue de cães nas diferentes fases clínicas submetidos ao tratamento com miltefosina;
- c) Caracterizar clinicamente os cães submetidos ao tratamento com miltefosina a fim de observar se houve ou não regressão dos sinais clínicos;
- d) Avaliar o perfil hematológico dos cães tratados com miltefosina nas diferentes fases clínicas;
- e) Avaliar o perfil renal e hepático dos cães tratados, por meio da dosagem sérica de ureia, creatinina, alanina aminotransaminase (ALT);
- f) Avaliar a morfometria do fígado, rim e baço dos animais tratados com miltefosina nas diferentes fases clínicas;
- g) Avaliar a expressão gênica de citocinas dos perfis Th1(IFN- γ) e Th2 (IL-4, IL-10) tratados com miltefosina.

7 MATERIAL E MÉTODOS

Para realização da análise preditiva dos animais tratados com miltefosina 2% foram feitas análises clínicas e exames complementares seguindo um tipo de estudo e etapas que alcançassem os resultados baseado nos objetivos elaborados conforme a pergunta condutora do estudo.

7.1 Tipo de estudo

Foi desenvolvido um estudo experimental de ensaio clínico não randomizado por conveniência (NEDEL; SILVEIRA, 2016), com a finalidade de observar a evolução do quadro clínico, os parâmetros hematológicos e bioquímicos, a morfologia dos órgãos (rins, fígado e baço), a carga parasitária e a resposta imune de cães com LV submetidos ao tratamento com miltefosina 2% introduzida no Brasil em 2016.

7.2 Local da pesquisa

O estudo foi realizado na Clínica Escola de Medicina Veterinária do Centro Universitário Cesmac, localizada no município de Marechal Deodoro no Estado de Alagoas (Figura 11), onde foram atendidos os cães submetidos aos exames clínicos, hematológicos, bioquímicos e ultrassonográficos. As amostras biológicas obtidas foram processadas no Laboratório de Doenças Parasitárias e Análises Clínicas da mesma instituição e local. Contudo, os testes de ELISA, RIFI e qPCR para fins de diagnóstico da LV e a RT qPCR para avaliação da expressão gênica das citocinas foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Parasitologia Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz - Pernambuco.

Figura 11 - Clínica Escola de Medicina Veterinária do Centro Universitário Cesmac



Fonte: google-earth.gosur.com

7.3 Amostra e amostragem

A amostragem foi por conveniência (REIS, 2003) seguindo o tipo de estudo experimental de ensaio clínico não randomizado por conveniência (NEDEL; SILVEIRA, 2016). Desta forma foi possível atender 41 animais e acompanhar 20 animais, os quais foram atendidos na Clínica Escola de Medicina Veterinária do Centro Universitário, localizado em Marechal Deodoro-AL considerada área endêmica para LV (Figura 11).

Foram incluídos no estudo cães domiciliados, de idade e raça variada, de ambos os sexos, independente de origem, mas que tenha realizado o diagnóstico para *L. infantum*, pelos testes de DPP, ELISA e qPCR conforme fluxograma (Figura 12). Para compor a divisão dos grupos foi necessário que os cães fossem livres de endo e ectoparasitas, além de hemoparasitas como *Ehrlichia*, *Babesia* e *Anaplasma*. Não fizeram parte dos grupos animais idosos, filhotes, animal gestante e cães severamente doentes, devido ao comprometimento dos órgãos de forma a inviabilizar o tratamento. Não participaram também da pesquisa os cães cujos tutores não autorizaram e conseqüentemente não assinaram ou ainda declinaram do TCLE.

Assim, foram separados 20 animais de ambos os sexos, raças e idades variadas independente da origem. Os 20 cães foram divididos em 4 grupos de 5 animais seguindo a classificação de um grupo de estudiosos da LVC denominado de “*Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG)*”. A divisão seguiu o diagnóstico e sinais clínicos observados e descrita por Paltrinieri *et al.* (2010) ratificada pelo descrita por Paltrinieri *et al.* (2016), baseado em Roura *et al.* (2013), Sollano-Galliego *et al.* (2011) e Sollano-Galliego *et al.* (2010), ilustrado em fluxograma adaptado de Paltrinieri *et al.* (2010) conforme figura 12. Detalhado em grupos na quadro 1 adaptada de Roura *et al.* (2013).

Grupo 1: Cães doentes- Com alterações clínicas típicas, sorologia positiva com titulação alta; alterações hematológicas, alterações bioquímicas. Grupo 2: Cães infectados - Com ou sem sinais clínicos específicos, sorologicamente positivo com titulação baixa ou ainda negativa, reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) positiva ou parasitológico com microscopia positiva. Grupo 3: Cães expostos - animais sem sinais clínicos ou sinais clínicos inespecíficos, sorologia positiva com baixos níveis de anticorpos e qPCR negativa; Grupo 4: Controle negativo – animais assintomáticos e negativos para todos os testes, ou seja, animais saudáveis.

Figura 12 - Fluxograma de diagnóstico e sinais clínicos direcionado ao estabelecimento do status clínico do cão de áreas endêmicas para LVC



Fonte: A autora adaptado de Paltrinieri *et al.* (2010)

Legenda: A cor amarela representa animais considerado exposto. A cor laranja animais infectados. A cor vermelha animais doentes.

Quadro 1- Disposição da formação dos grupos adaptado da sugestão do *Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG)*

Diagnóstico	Grupos						
	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4
	Doente		Infectado		Exposto		Negativo
	Post	Neg	Post	Neg	Post	Neg	Neg
Clínica	X		X			X	X
Sorologia	X		X		X		X
qPCR	X		X			X	X
Hemograma	X		X		X		X
Bioquímica	X		X			X	X

Fonte: A autora baseado no *Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG)*

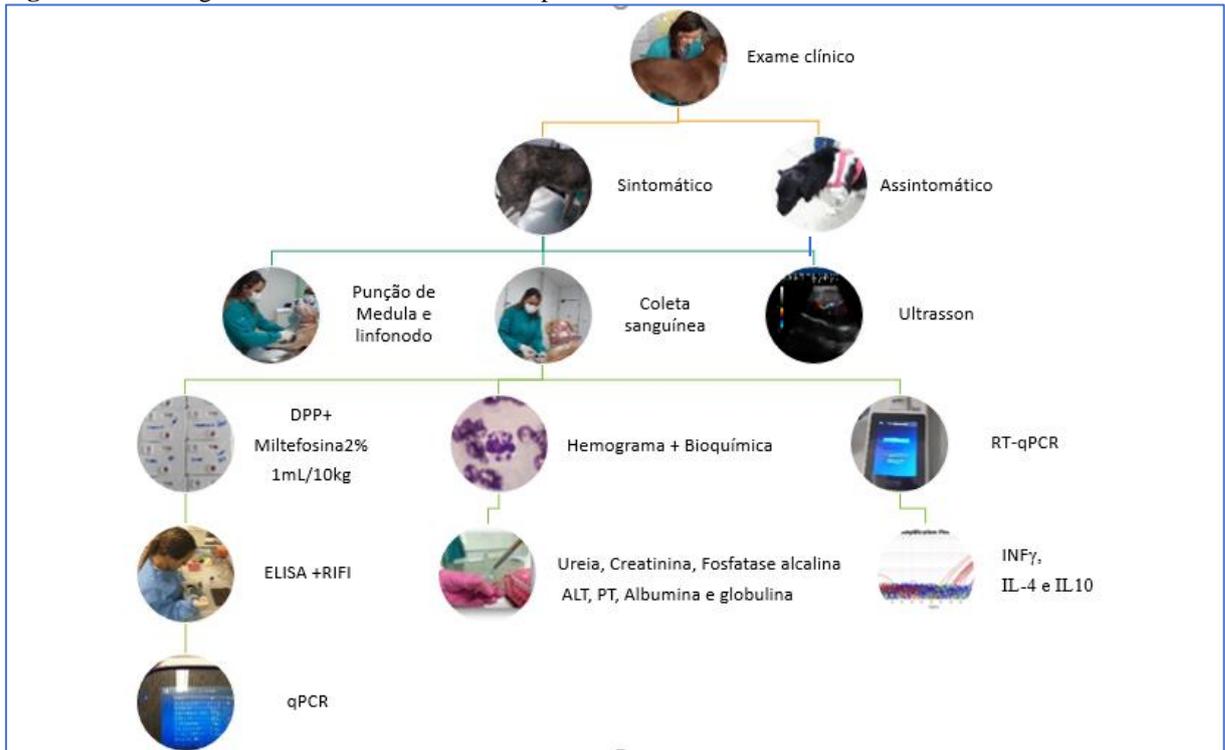
Legenda: O “X” na cor vermelha é indicativo de alteração presente ou positividade. O “X” em cor azul pode ou não ser positivo e/ ter ou não alteração. O “X” na cor preta indicação de ausência de alteração e resultados sem alteração.

7.4 Desenho Experimental

A pesquisa foi desenvolvida seguindo uma sequência possível de procedimentos conforme desenho experimental (Figura 13) seguindo do recrutamento dos animais, assinatura do TCL, início do atendimento clínico e realização dos testes rápidos de triagem (TRT). O início do tratamento com miltefosina 2% na dose de 1mL/10Kg/dia por 28 dias teve início após resultado positivo ao TRT.

Paralelamente ao exame clínico foi realizada coleta sanguínea para realização dos testes e exames ilustrados no desenho experimental. Mediante os resultados obtido foi dado início a separação dos animais para formação dos grupos.

Tutores que se recusaram a assinar o TCLE ou declinaram deste, ou ainda tutores dos quais os animais estavam em estado terminal, ou ainda idosos, filhotes lactantes ou gestantes, foram excluídos das pesquisas ou nem iniciada a sua participação.

Figura 13 - Fluxograma ilustrativo do desenho experimental

Fonte: A autora, 2021

7.5 Exame Clínico (caracterização clínica dos cães)

Inicialmente foi realizado o exame físico-clínico do animal de acordo com (BICHARD; SHERING, 1998) o qual foram observados os parâmetros de frequência cardíaca (Figura 14); frequência respiratória; tempo de perfusão capilar; temperatura retal; palpação (Figura 15); verificação de coloração de mucosas, presença de ectoparasitas e lesões de pele, bem como presença de secreção ocular e/ou genital dos animais, conforme anexo 1 e separados clinicamente em sintomáticos e assintomáticos.

Na avaliação clínica foi considerado subdivididos animais sintomáticos em: Oligossintomáticos (animais com até 3 sinais clínicos) e polissintomáticos (animais que apresentaram mais de 3 sinais clínicos). Com base nos resultados foram direcionados aos seus respectivos grupos (Doente, infectado e exposto), a fim de promover análises observacionais quanto a clínica, mesmo sem os resultados de diagnóstico conclusivos da LVC.

Figura 14 - Exame clínico: auscultação

Fonte: A autora, 2021

Figura 15 - Exame clínico: Palpação

Fonte: A autora, 2021

7.6 Coleta sanguínea

Foram realizadas 3 coletas sanguíneas no tempo “0” (T0) antes do tratamento, no tempo 20 (T20) 20 dias do início do tratamento e no tempo 30 (T30) 30 dias após o início do tratamento. Para tal, a coleta foi realizada na Clínica Escola do Centro Universitário, onde os animais foram contidos, através do uso de focinheira (Figura 16). Em seguida o animal foi colocado em decúbito para a coleta de 5 a 9 mL (conforme porte do animal) por meio de venopunção da cefálica (Figura 17), safena lateral ou jugular, mediante prévia antissepsia com álcool 70%. Cada amostra foi dividida em 3 tubos:

- a) Tubo contendo etilenodiaminotetracético (EDTA 0,009 g/5ml de sangue) para conservação do DNA e aplicação da qPCR. Além da confecção de esfregaço sanguíneo para submissão aos testes hematológicos.
- b) Acondicionado em RNA later para conservação do RNA e realização da expressão gênica. Ambas as amostras foram acondicionadas e mantidas em freezer a -80°C para posterior extração de DNA e RNA;
- c) Sem EDTA para obtenção do soro e submissão aos testes de DPP, ELISA e RIFI, e testes bioquímicos.

Figura 16 - Contenção para coleta

Fonte: A autora, 2021

Figura 17 - Coleta sanguínea

Fonte: A autora, 2021

7.7 Processamento e armazenamento das amostras

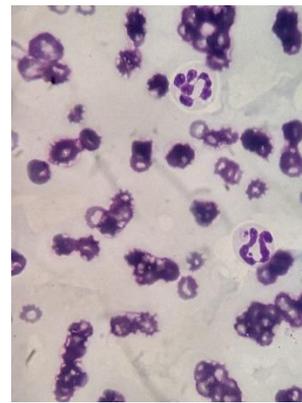
As amostras obtidas segundo item 7.6 sem anticoagulante foram centrifugadas a 3.500 rpm por 15 minutos (Figura 18) e parte do soro (Figura 19) foi submetido aos testes sorológicos descritos no tópico 7.8 e a outra parte do soro destinado a análise bioquímica (7.9.2), sendo conservadas até o momento dos testes à -20°C . As amostras contendo EDTA foram a priori, em parte estocadas a -80°C para posteriori descongelamento e realização da extração do DNA e aplicação da qPCR conforme item 7.8.2. A outra parte foi destinada aos exames hematológicos (7.9.1), sendo uma alíquota destinada a confecção de esfregaço para pesquisa de hemoparasitas (Figura 20) (7.8.3.2); As amostras com RNA later foram conservadas inicialmente a -80°C e depois descongeladas e feita a extração do RNA (7.11), transcrição reversa e amplificação do cDNA por RT-qPCR .

Figura 18 - Centrífuga

Fonte: A autora, 2021

Figura 19 - Soro

Fonte: A autora, 2021

Figura 20 - Esfregaço sanguíneo

Fonte: A autora, 2021

7.8 Diagnóstico sorológico

Foram utilizados para diagnóstico sorológicos teste pré-estabelecidos pelo Ministério da Saúde (M.S) aplicado ao diagnóstico da leishmaniose visceral canina no Brasil, além da Reação de imunofluorescência indireta não mais exigida pelo M.S.

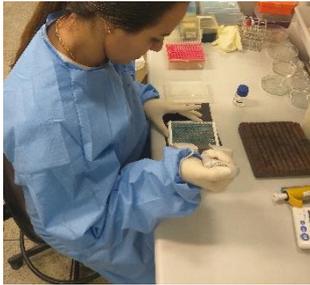
7.8.1 Testes sorológicos para *L. infantum*: ELISA, RIFI e DPP

Diagnóstico para as leishmanioses (identificação de cães positivos/presença e quantificação de imunoglobulina G)

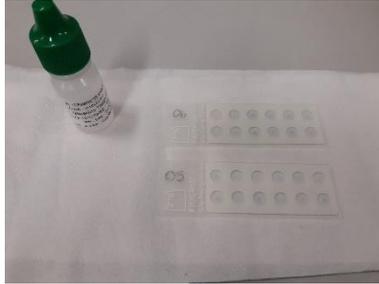
A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* em soro foi realizada utilizando o teste imunoenzimático (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay* - **ELISA**) de Bio – Manguinhos / FIOCRUZ que detecta anticorpos anti- antígenos total de *Leishmania-major-like* (FUJIMORI *et al.*, 2021) de acordo com as instruções contidas no kit (Figura 21).

A reação de imunofluorescência indireta (**RIFI**) foi desenvolvida *in house* utilizando lâminas sensibilizadas com antígenos de promastigotas de *L. infantum* oriundas de cultura em meio Schneider. Foi utilizado o conjugado IgG anti cão da SIGMA, seguindo o protocolo de RIFI para diagnóstico de Leishmaniose de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (Figura 22).

O *Dual Plate Platform* (**DPP**) que é classificado como teste rápido imunocromatográfico (TRI), o qual usa a tecnologia Dipstick com proteína recombinante rK28 construída de uma proteína quimérica de rK9, rK26 e rK39 de *Leishmania infantum* (FUJIMORI *et al.*, 2021) foi utilizado seguindo as instruções contidas nos kits da Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. Devido a sua sensibilidade o teste também foi utilizado para verificação do momento da soroconversão (Figura 23).

Figura 21 - ELISA

Fonte: A autora, 2021

Figura 22 - RIFI

Fonte: A autora, 2021

Figura 23 - Kit DPP

Fonte: A autora, 2021

Os métodos foram usados, ainda, para identificar a partir da densidade óptica (D.O) no ponto de corte estabelecido aumento ou decréscimo dos níveis de IgG no método de ELISA e estimar alta e baixa produção através da reação da intensidade da cor no ensaio imunocromatográfico conforme figuras 24, 25 e 26.

Figura 24 - DPP positivo

Fonte: A autora, 2021

Figura: 25 - DPP fraco positivo

Fonte: A autora, 2021

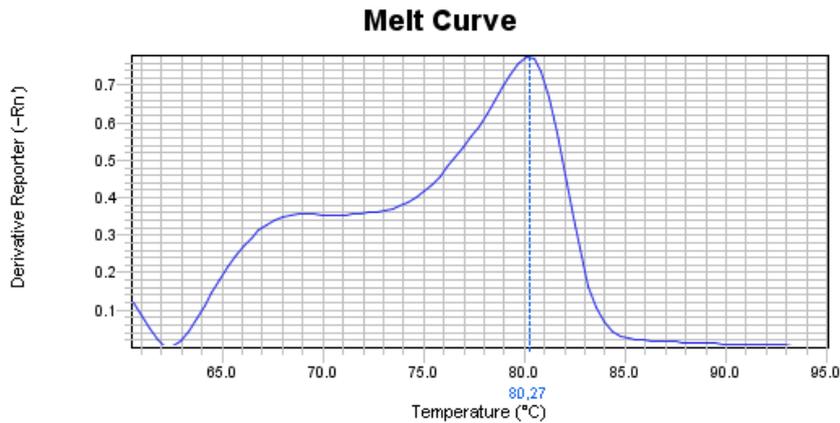
Figura 26 - DPP Negativo

Fonte: A autora, 2021

7.8.2 Diagnóstico molecular usando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para *Leishmania infantum*:

A qPCR foi utilizada como método de diagnóstico de *L. infantum* em associação com os testes sorológicos para definição dos grupos. Foram consideradas positivas amostras com detecção de DNA de *L. infantum* confirmada pela curva logarítmica de amplificação, com temperatura de Melt próxima de 80°C (Figura 27). A qPCR, ainda, foi usada para monitoramento da carga parasitária durante o tratamento com a miltefosina e quantificação das citocinas. Para diagnóstico e quantificação foi utilizado foi usado o sistema LINF 1B com utilização de SYBR Green, que detecta um fragmento de 132 pares de bases do kDNA do Complexo *L. donovani* (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2009). Foi utilizada a curva padrão de DNA genômico de *L. infantum* de 1 ng a 1 fg com fator de diluição 10 e o controle negativo (amostra sem DNA). O volume final utilizado foi de 50 µL, sendo 25 de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems).

Figura 27 - Amostra positiva com curva de Melt com temperatura próxima de 80°C



Fonte: A autora, 2021

7.8.2.1 Extração de DNA

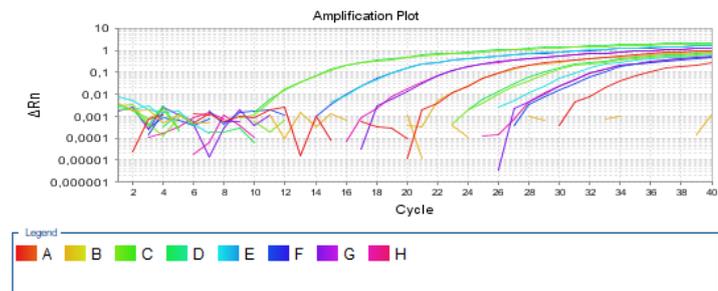
Foi utilizado o Wizard® Genomic DNA Purification Kit da Promega São Paulo-Brasil, seguindo as instruções do fabricante, o qual consiste em:

- 1) Utilizar 300 µl de volume de amostra de sangue total com 900 µl de solução de lise celular a um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.
- 2) Agitar suavemente o tubo de sangue até ficar bem misturado; depois transfira o sangue para o tubo que contém a solução de lise celular. Inverter o tubo 5 a 6 vezes para misturar.
- 3) Incubar a mistura por 10 minutos em temperatura ambiente (inverta 2-3 vezes uma vez durante a incubação) para lisar os glóbulos vermelhos. Centrifugar a 13.000–16.000 × g por 20 segundos em temperatura ambiente para 300 µl de amostra.
- 4) Remover e descarte o máximo de sobrenadante possível sem perturbar o sedimento branco visível. Aproximadamente 10–20 µl de líquido residual permanecerão no tubo de 1,5 ml (amostra de 300 µl). Repetir as etapas 1 a 4 até o pellet ficar branco.
- 5) Agite o tubo no vórtex vigorosamente até que os glóbulos brancos sejam ressuspensos (10 a 15 segundos). Ressuspender completamente os glóbulos brancos para obter uma lise celular eficiente.
- 6) Adicionar à solução de lise de núcleo (300 µl para o volume da amostra de 300 µl); pipetar a solução 5 a 6 vezes para lisar os glóbulos brancos. A solução deve se tornar muito viscoso.
- 7) Se aglomerados de células forem visíveis após a mistura, incubar a solução a 37 ° C até que os aglomerados sejam interrompidos.

- 8) Adicionar a solução de precipitação de proteínas (100 μ l para 300 μ l de volume de amostra; e agite no vórtex vigorosamente por 10 a 20 segundos. Pequenos aglomerados de proteínas podem ser visíveis após o vortice.
- 9) Centrifugar a 13.000–16.000 \times g por 3 minutos em temperatura ambiente para um volume de amostra de 300 μ l. Um pellet de proteína marrom escuro deve estar visível (Figura 28). Se nenhum pellet for observado, consulte a Seção
- 10) Para um volume de amostra de 300 μ l, transferir o sobrenadante para um tubo de microcentrífuga limpo de 1,5 ml contendo 300 μ l de isopropanol à temperatura ambiente.
- 11) Misturar delicadamente a solução por inversão até que os filamentos brancos de DNA do tipo filamento formem uma massa visível.
- 12) Centrifugar a 13.000–16.000 \times g por 1 minuto em temperatura ambiente para 300 μ l de amostra.
- 13) Decantar o sobrenadante e adicione um volume de amostra de etanol a 70% em temperatura ambiente ao DNA. Inverter suavemente o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA e as laterais do tubo de microcentrífuga. Centrifugue como na Etapa 12.
- 14) Aspirar cuidadosamente o etanol usando uma pipeta de *Pasteur* extraída ou uma ponta de pipeta de sequenciamento. Inverter o tubo limpe o papel absorvente e seque ao ar por 10 a 15 minutos.
- 15) Adicionar a solução de reidratação (água) de DNA (100 μ l para volume de amostra de 300 μ l) ao tubo e reidratar o DNA incubando a 65 ° C por 1 hora. Misturar periodicamente a solução batendo suavemente no tubo. Como alternativa, reidratação do DNA incubando a solução durante a noite à temperatura ambiente ou a 4 ° C.
- 16) Armazenamento do DNA entre 2 e 8 ° C. Teste de curva padrão (Figura 29)

Figura 28- Pellet de *L.infantum*

Fonte: A autora, 2021

Figura 29 - Curva de logarítmica de DNA *L.infantum* de 1 ng a 1 fg

Fonte: A autora, 2021

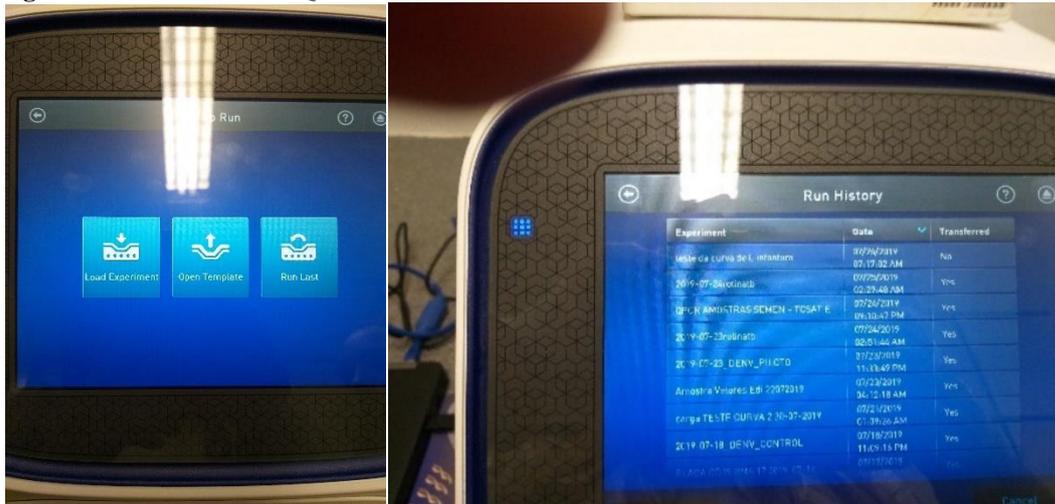
7.8.2.2 Preparação e aplicação do Master Mix

Para detecção de *L. infantum*, foi usado o sistema LINf 1B com utilização de *SYBR Green*, que detecta um fragmento de 132 pares de bases do kDNA do Complexo *L. donovani* (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2009). Foi utilizada a curva padrão de DNA genômico de *L. infantum* de 1 ng a 1 fg com fator de diluição 10 e o controle negativo (amostra sem DNA). O volume final utilizado foi de 50 μL , sendo 25 de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), 1,0 μL do *primer* Linf 1B *Forward* (5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3') e 1,0 μL do *primer* Linf 1B *Reverse* (5'-TTACACCAACCCCCAGTTTC-3'), 21 μL de água tipo 1 e 2 μL de DNA genômico de *L. infantum* (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2009).

7.8.2.3 Termociclador

A placa ou tubos contendo o mix e as amostras analisadas foram submetidos ao termociclador QuantStudio 5 (Figura 30) sistema de PCR em tempo real (Termo Fisher Scientific-BR) nas condições de temperatura padrão do aparelho (95°C/15 s e 60°C/1 min e 72°C/30s) e gerando um sistema de gráficos para análise.

Figura 30 - Termociclador QuatStudio 5



Fonte: A autora, 2021

7.8.3 Diagnóstico parasitológico

Foram realizados mais de um método para detecção do parasito, incluindo pesquisa em lâmina até identificação do DNA em amostras de sangue.

7.8.3.1 *Biópsia de medula e linfonodo para diagnóstico de Leishmania infantum*

Para os animais cujo procedimento de coleta incluiu punção medular (Figura 31) e/ou de linfonodo (Figura 32), houve aplicação subcutânea de atropina, na dose de 0,044 mg/kg como medicação pré-anestésica (MPA) e após 5 a 10 minutos de latência, sendo observada uma discreta taquicardia, foi então iniciada anestesia dissociativa com aplicação por via intramuscular de xilazina (1mg/kg) e cetamina (15 mg/kg), as duas drogas na mesma seringa. Após cinco minutos de latência (MASSONE, 2008), foi dado início a punção de medula óssea na crista do osso esterno (seringa de 20 mL, agulha 40 x1,20 mm) e/ou punção de linfonodo poplíteo (seringa de 10 mL, agulha 0,25X7mm). Apenas animais que apresentaram hipertrofia do linfonodo poplíteo foram destinados à punção aspirativa do mesmo, desde que consentimento do tutor. O procedimento anestésico apresenta duração média de 40 a 50 minutos. Animais idosos não foram incluídos, devido ao risco de bradicardia. Durante todo o procedimento, os animais foram acompanhados por médico veterinário, sendo monitorados os reflexos interdigital e palpebral, bem como a frequência cardíaca. O uso da atropina como MPA, evita os efeitos parassimpatomimético (PSNS) da xilazina. Após o procedimento de coleta, os animais foram observados durante a recuperação por 50 a 60 minutos.

Foi feito *squash* a partir de espículas medulares obtidas da biopsia e analisadas em microscópio óptico na marca Nikon Eclipse E200 na objetiva de 100x. A visualização de formas amastigotas determina a positividade da amostra.

Figura 31 - Punção de Medula



Fonte: A autora, 2021

Figura: 32- Punção de linfonodo

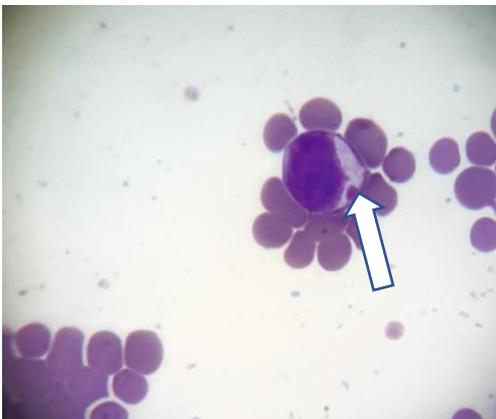


Fonte: A autora, 2021

7.8.3.2 Pesquisa de hemoparasita (*Pesquisar, identificar a presença de hemoparasitas*)

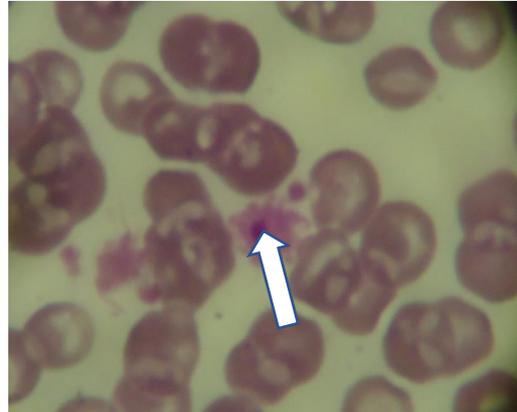
Foram confeccionados estiraços sanguíneos, os quais foram corados com corante rápido para hematologia (Panótipo) e realizada a pesquisa por parasitos nas lâminas em microscópio Nikon Eclipse E200 na objetiva de 100x. Foram pesquisadas hemácias, neutrófilos, monócitos, plaquetas para identificação de *Babesia*, *Anaplasma Phagocitophurum*, *Ehrlichia canis* (Figura 33), *Anaplasma platys* (Figura 34). Foi utilizada a capa leucocitária a fim de aumentar a sensibilidade para visualização de *Ehrlichia* e *Anaplasma* (RISTOW; JACOLME, 2018).

Figura 33 - *Ehrlichia canis*



Fonte: A autora, 2021

Figura 34 - *Anaplasma platys*



Fonte: A autora, 2021

7.9 Exames complementares

Foram realizados exames complementares a fim de monitorar a evolução do animal ao tratamento e prever sobre seu estado clínico.

7.9.1 Análise hematológica (perfil hematológico dos cães)

Foi aplicada a metodologia do hemocítmetro para determinação do número total de hemácias e leucócitos, utilizando os diluentes de Gower e Turk, respectivamente. O volume globular será determinado seguindo a metodologia do microhematócrito. A hemoglobina foi determinada utilizando a metodologia do cianometahemoglobina e a contagem diferencial dos leucócitos, bem como a avaliação da morfologia das células através do estiramento sanguíneo corado por corante rápido para hematologia (THRALL, 2015). Esses exames foram realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas do Centro Universitário.

7.9.2 Análise bioquímica (Verificação da função hepática e renal dos cães)

Os parâmetros para avaliação hepática foram: Alanina aminotransferase (ALT), conforme metodologia cinética UV – IFCC; Fosfatase alcalina (ALP), com a metodologia Bowers e Mc Comb Modificado, Proteínas totais, método Biureto e Albumina, Verde de Bromocresol. Para isto, foram utilizados kits bioquímicos comerciais da marca Labtest®, e a leitura das amostras realizada em analisador bioquímico semi-automático Bioplus® Bio200, previamente calibrado, segundo as recomendações do fabricante dos kits. Para a avaliação da função renal, foram avaliados os parâmetros: creatinina, utilizando a metodologia cinética, e o teste de ureia, com a metodologia enzimática UV. Para isto, foram utilizados kits bioquímicos comerciais da marca Labtest Biotecnologia®, e o analisador bioquímico semi-automático Bioplus Bio200, segundo as recomendações do fabricante dos kits (THRALL, 2015). Os exames foram realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas do Centro Universitário.

7.9.3 Ultrassom com Doppler (Preservação morfométrica dos fígado, baço e rim)

A avaliação ultrassonográfica foi efetuada utilizando transdutor microconvexo multifrequencial (Mylab Five, Esaote, Brasil) e software power Doppler e dopplerfluxometria com o objetivo de avaliar os aspectos ecográficos do fígado, baço e rim, bem como foi

determinado o índice pulsátil e índice de resistência vascular desses órgãos. As características e os critérios de avaliação renal seguirão a classificação descrita por Santos (2009). O exame foi realizado no Laboratório de imagens da Clínica Escola de Medicina Veterinária do Cesmac.

7.10 Tratamento endectocida, babesicida, bactericida e leishmanicida

Os animais positivos e negativos foram submetidos ao tratamento endectocida. A fim de eliminar parasitas gastrointestinais foi administrado ivermectina + pirantel + praziquantel + febantel por via oral em dose única. Para controle de pulgas, carrapatos, piolhos foi utilizado coleira à base de deltametrina à 4%. Em casos de animais já tratados não foi repetido o tratamento para qualquer das doenças parasitárias citadas acima.

Animais com alteração no hemograma sugestivo de hemoparasitose e/ou presença de hemoparasitas na lâmina para *Babesia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* foram tratados com dipropionato de imidocarb na dose de 3,5mg/kg, o equivalente a 1mL do produto para cada 20kg por via intramuscular e repetido com 15 dias e doxiciclina na dose de 50mg/10kg a cada 12 horas durante 21 dias. Salientado que em casos de animais infectados com algum desses agentes e antes de iniciar o tratamento com miltefosina os animais foram tratados com o protocolo citado para cada caso citado. Em casos de animais já tratados não foi repetido o tratamento para qualquer das doenças parasitárias citadas acima. A miltefosina só foi administrada à 2% por via oral na dose de 1mL/10kg/dia durante 28 dias após tratamento parasitário.

7.11 Avaliação da resposta imune frente a infecção por *L. infantum* (Expressão de citocinas)

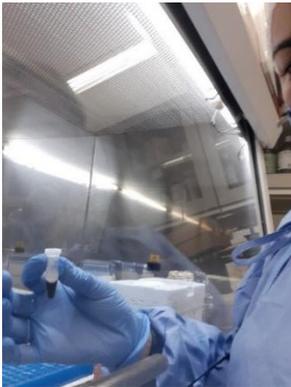
Etapas para avaliação da resposta imune descrita na sequência realizada à partir da extração.

7.11.1 Extração de RNA

A extração do RNA (Figura 35) total foi realizada segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001), modificado. Foi utilizado 300 µL de sangue total, o qual foi centrifugado e o sedimento ressuspenso em Tiocianato de Guanidina. O RNA foi precipitado com isopropanol e ressuspenso em H₂O ultra pura livre de RNases. Posteriormente foi

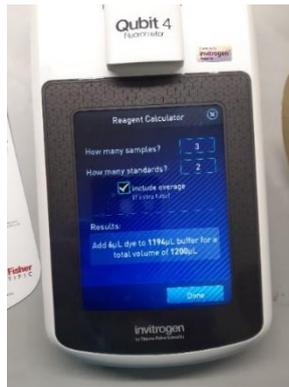
realizada a purificação com DNase (DNase I – Sigma Aldrich) segundo normas do fabricante. O RNA obtido foi quantificado em NanoDrop 2000 e no Qubit 4 (Figura 36) e a pureza e integridade conferida em gel de agarose 1% (Figura 37) preparado em água DEPC (Água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato). A partir do RNA obtido foi realizada a síntese do cDNA para utilização nos ensaios de RT-qPCR.

Figura 35 - Extração de RNA



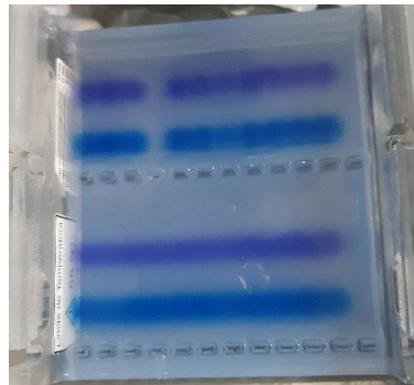
Fonte: A autora, 2021

Figura 36 - Qubit



Fonte: A autora, 2021

Figura 37 - Gel de agarose 1%



Fonte: A autora, 2021

7.11.2 Síntese de cDNA

A síntese dos cDNAs para detecção dos mRNA's das citocinas analisadas foi realizada pelo sistema de transcrição reversa utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) desenvolvido com base no protocolo do fabricante. O controle negativo das amostras foi a amostra em duplicata do RNA sem a enzima transcriptase. Para transcrição foi utilizado o termociclador Bioer Gene Pro Térmica cyler TC-E-96G e o termociclador SimpliAmp Thermal Cycler da Applied biosystems (Figura 38) nas condições indicadas pelo fabricante (Figura 39). Foi seguido as recomendações do fabricante esquema da figura 39.

Figura 38 - Termociclador



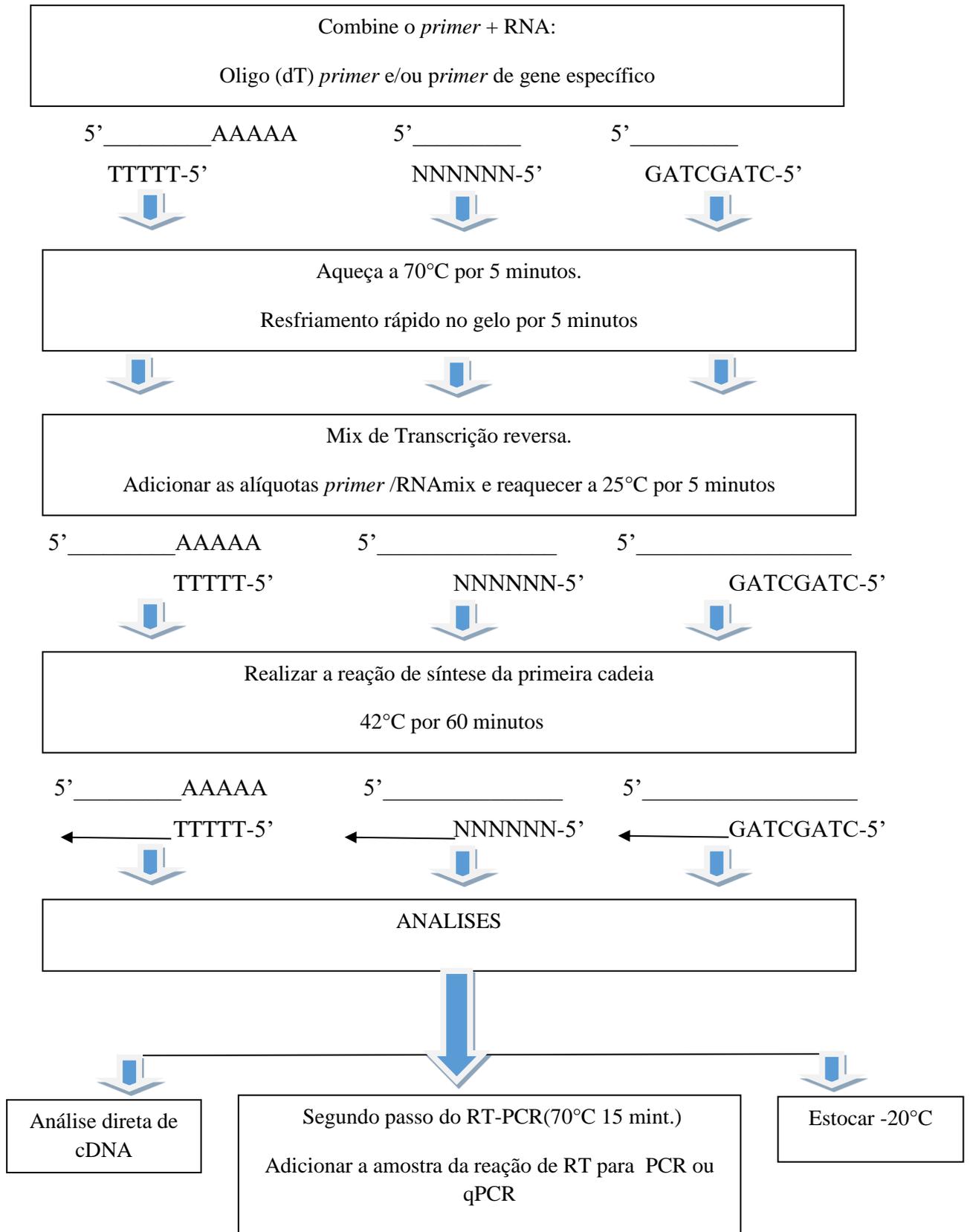
Fonte: A autora, 2021

Figura 39 - Condições de ciclagem



Fonte: A autora, 2021

Figura 40 - Esquema geral de opções de síntese de cDNA e tipos de análises usando ImProm-II™ Reverse Transcription System.

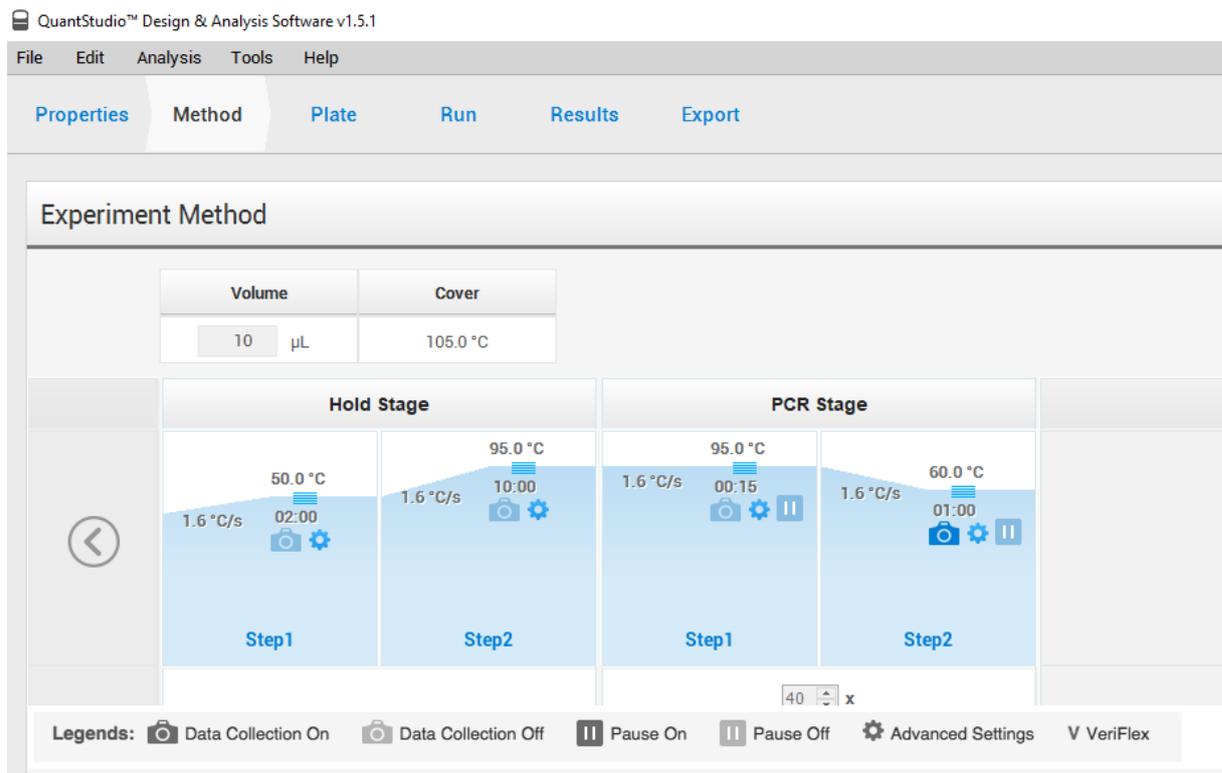


Fonte: Promega Corporation

7.11.3 Avaliação da expressão das citocinas

O cDNA foi amplificado utilizando sondas customizadas para detecção dos genes alvo e (INFo genes de referência (β -actina). As amostras foram analisadas no termociclador QuantStudio 5 da Real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific-BR) nas condições convencionais de ciclagem da máquina (Figura 41), utilizando uma reação final de 10 μ L, sendo 5 μ L de 2x Master Mix (Applied Biosystems), 0,5 μ L 20x TaqMan Assay, 2,5 μ L de água (DEPC) e 2 μ L de cDNA. Para cada placa foi utilizado controle negativo, apenas com o mix. Todas as amostras foram analisadas em duplicata técnica e biológica. As curvas padrão dos genes de referência mostraram resultados com eficiência (> 90%). Uma quantificação relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Neste método, a quantificação relativa foi dada pela razão entre os valores médios de CT (limiar do ciclo) dos genes alvo e o genes de referência (β -actina).

Figura 41 - Condições de ciclagem utilizada para quantificação dos genes alvos e de referência



Fonte: A autora, 2021

Os genes alvos foram IL-4 (Cf02623112_m1/ IL4 / cat# 4331182/Inventoried/FAM-MGB/S:250 rxns), IFN- γ (Cf02623316_m1 IFNG /cat# 4331182 Inventoried/FAM/MGB/S:250 rxn), IL-10 (Cf02624265_m1/IL10 / cat# 4331182/Inventoried/FAM-MGB/S:250

rxns) e como gene endógeno a β -Actina (Cf04931159_m1 ACTB/ cat# 4331182 Inventoried FAM-MGB/S:250 rxns).

7.14 Análise dos dados

Os dados foram tabulados e classificados de acordo com os grupos estudados (G1, G2 G3 e G4), assim como o momento em que cada parâmetro hematológico foi avaliado (0, 20 e 30 dias). Para avaliar a normalidade dos dados foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As médias foram comparadas utilizando-se análise de variância (One-Way ANOVA), seguido do teste de teste de Student Newman-Keuls (SNK). Todos os dados foram analisados através do software R Studio v1.4 e as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

8 ASPECTOS ÉTICOS

A alta taxa de prevalência normalmente obtida nesses trabalhos possibilitou a inclusão de números suficientes de cães LV positivos para a realização das análises de grupos. Os proprietários dos animais foram convidados a participar da pesquisa e a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a utilização do material coletado para fins científicos. O projeto foi submetido e aprovado na comissão do CEUA do Centro Universitário Cesmac, visto que a pesquisa com os animais foi desenvolvida na referida instituição com o título: “O uso do teste imunocromatográfico na detecção de imunoglobulinas G anti-*Leishmania infantum* em cães com leishmaniose visceral, submetidos ao tratamento com miltefosina” com número de protocolo de aprovação: 13A-2018 (Anexo B).

9 RESULTADOS

Os resultados foram analisados e expostos em forma de gráficos, imagens e tabelas seguindo a sequência dos objetivos específicos presentes nesta tese.

9.1 Resultados sorológicos

Os resultados obtidos durante o monitoramento sorológico mostraram que houve soroconversão em animais expostos e infectados submetidos ao tratamento com miltefosina 2% (Tabelas 1 e 2). Observou-se ainda que 100% dos animais expostos negativaram em um dos testes sorológicos utilizados para o monitoramento como mostra na tabela 1, demonstrando a redução dos níveis de IgG mediante a ação da miltefosina.

O grupo infectado também apresentou soroconversão em 40% (2/5) dos animais ao RIFI, não sendo observado nos demais testes aplicados (Tabela 2). Não foi verificado soroconversão em animais doentes (Tabela 3). Todos os animais do grupo controle se mantiveram negativos durante o período da pesquisa tanto no DPP quanto no ELISA e no RIFI, não sendo observado nenhuma soroconversão neste grupo (Tabela 4).

No grupo exposto, conforme tabela 2, é verificado que no ELISA os níveis de IgG são em sua maioria decrescente em 80% (4/5) dos casos. Houve soroconversões correspondendo a 33,3% (2/3) com base no cut-off do teste que no estudo foi de 0,371. Ainda neste grupo a mudança sorológica de positivo para negativo foi observada em 80% (4/5) dos cães utilizando o DPP e 20% (3/5) no RIFI. É possível perceber que animais expostos submetidos ao tratamento com miltefosina negativaram tanto em testes quantitativos quanto qualitativos.

Tabela 1 - Monitoramento sorológico dos cães no grupo exposto em diferentes tempos tratado com miltefosina

Grupo Exposto	ELISA			DPP			RIFI		
	Cut-off 0,371						Cut-off 1:40		
	0	20	30	0	20	30	0	20	30
Bradock	0.497	0.476	0.566	+	+	+	+	+	-
Martinho	0.250	0.157	0.140	+	-	-	+	-	-
Ney	0.184	0.256	0.229	+	-	-	+	-	-
Ivete	0.434	0.272	0.145	+	-	-	-	-	-
Lili	0.372	0.356	0.306	+	-	-	+	+	+

Fonte: A autora, 2021

Tabela 2 - Monitoramento sorológico dos cães no grupo infectado em diferentes tempos tratado com miltefosina

Grupo Infectado	ELISA			DPP			RIFI		
	Cut-off 0,371						Cut-off 1:40		
	0	20	30	0	20	30	0	20	30
Belinha	0.797	0.913	0.473	+	+	+	+	-	-
Raposa	0.422	0.408	0.551	+	+	+	+	+	+
Megg	0.791	1.157	1.182	+	+	+	-	-	+
Shwiro	0.768	0.951	1.152	+	+	+	+	-	-
Pipa	1.045	0.827	1.091	+	+	+	+	-	-

Fonte: A autora, 2021

Tabela 3 - Monitoramento sorológico dos cães no grupo doente em diferentes tempos tratado com miltefosina

Grupo Doente	ELISA			DPP			RIFI		
	Cut-off 0,371						Cut-off 1:40		
	0	20	30	0	20	30	0	20	30
Angelica	1,203	1,340	1,514	+	+	+	-	-	-
Galo	0.885	1.076	1.017	+	+	+	+	+	+
Linda Jones	1.113	1.370	1.501	+	+	+	-	-	-
Dani Bondi	1.127	1.155	1.091	+	+	+	+	+	+
Tilico	1.346	1.068	1.509	+	+	+	+	-	-

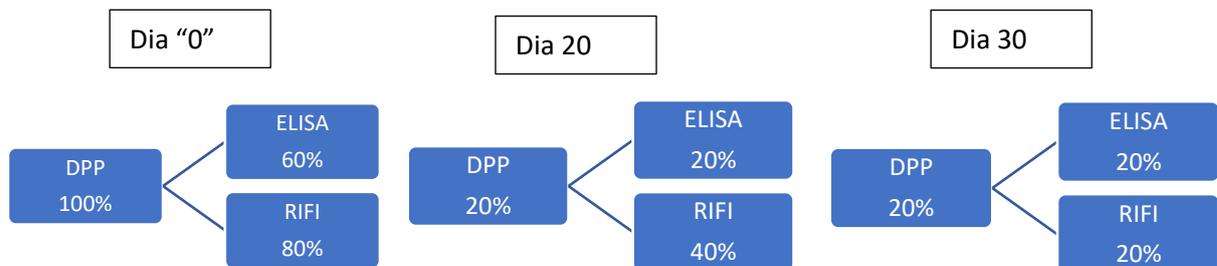
Fonte: A autora, 2021

Tabela 4 - Monitoramento sorológico dos cães no grupo controle sem tratamento

Grupo Negativo	ELISA Cut-off 0,371			DPP			RIFI Cut-off 1:40		
	0	20	30	0	20	30	0	20	30
	Costela	0.209	0.163	0.197	-	-	-	-	-
Bombom	0.197	0.235	0.197	-	-	-	-	-	-
Toby	0.224	0.179	0.241	-	-	-	-	-	-
Favela	0.251	0.285	0.276	-	-	-	-	-	-
Catita	0.268	0.310	0.210	-	-	-	-	-	-

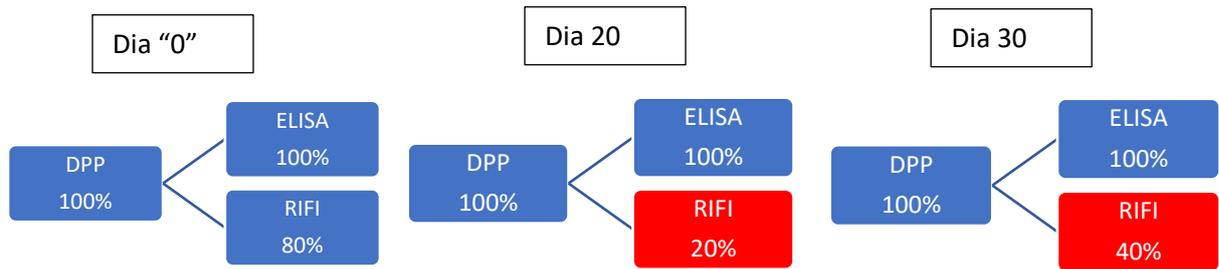
Fonte: A autora, 2021

As figuras 42, 43 e 44 ilustram em forma hierárquica os diferentes resultados que podem ter animais submetidos ao tratamento com miltefosina, dependendo do teste que seja solicitado para o diagnóstico ou monitoramento da doença. Foi verificado, neste estudo, níveis de anticorpos baixos ao ponto de não serem detectados em alguns métodos sorológicos aplicados, com variedade no percentual de detecção entre eles, conforme fluxograma representado pela Figura 42.

Figura 42 - Fluxograma de diagnóstico sorológico do grupo expostos

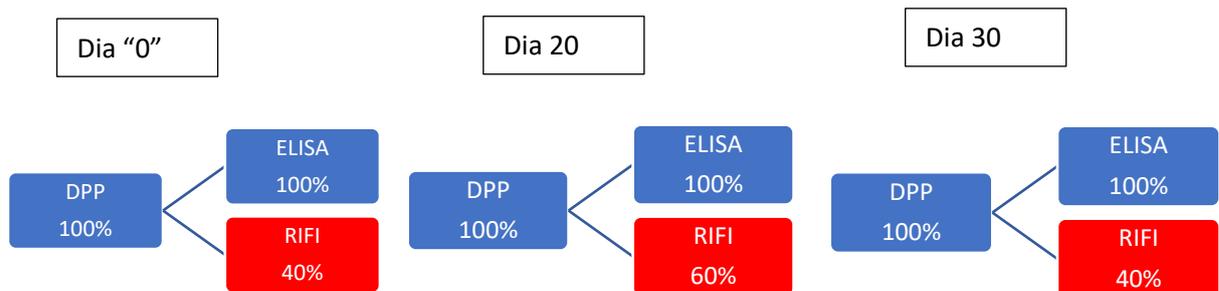
Fonte: A autora, 2021

Legenda: resultados sorológicos em percentual, dos animais tratados com miltefosina, do grupo exposto durante o monitoramento

Figura 43 - Fluxograma de diagnóstico sorológico do grupo infectado

Fonte: A autora, 2021

Legenda: resultados sorológicos em percentual, dos animais tratados com miltefosina, do grupo infectado durante o monitoramento

Figura 44 - Fluxograma de diagnóstico sorológico do grupo doente

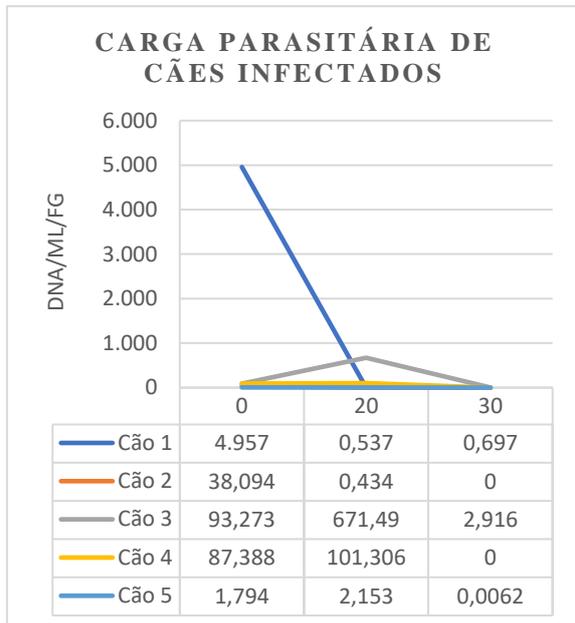
Fonte: A autora, 2021

Legenda: resultados sorológicos em percentual, dos animais tratados com miltefosina, do grupo doente durante o monitoramento

9.2 Resultado da carga parasitária obtida pela qPCR

A carga parasitária foi reduzida em 80% dos animais dos grupos infectados e doentes ao longo do tratamento, como mostra os gráficos 1 e 2. No grupo de infectado não foi detectado DNA de *L. infantum* em 20% (1/5) das amostras ao vigésimo dia do tratamento. Após o tratamento não foi detectado DNA de *L. infantum* na amostra de 60% (3/5) dos cães do grupo infectado. Apenas 20% (1/5) do referido grupo teve aumento progressivo da carga parasitária durante e logo após o tratamento.

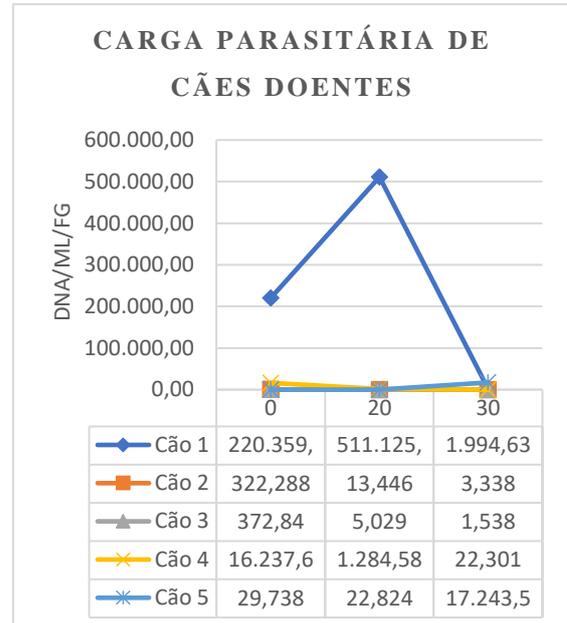
Gráfico 1 - Carga Parasitária dos animais infectados submetidos ao tratamento com miltefosina 2% nos tempos 0, 20 e 30 dias.



Fonte: A autora, 2021

Legenda: Resultados do monitoramento da carga parasitária obtida em fg de DNA por μL de amostra de sangue total de cada animal em diferentes tempos do grupo infectado (Gráfico 1) e do grupo doente (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Carga Parasitária dos animais doentes submetidos ao tratamento com miltefosina 2% nos tempos 0, 20 e 30 dias



9.3 Resultados da análise clínica dos animais antes durante e após o tratamento

Na análise clínica realizada nos animais tratados com a miltefosina 2%, observou-se uma melhora clínica ao final do tratamento (Figura 45A-D). Entretanto aos 20 dias foi verificada a piora clínica em alguns grupos, o que culminou com o declínio do TCLE de alguns tutores dos animais em participar da pesquisa. A evolução da melhora clínica, em alguns animais, pode chegar a ausência de sinais clínicos. Os resultados observados quanto a progressão da melhora clínica após o término do tratamento mudou em alguns grupos o *status* clínico para assintomático, conforme figuras 46A-C.

Figura 45 – Evolução clínica do paciente Shwiro.



Fonte: A autora, 2021

Legenda: A: com 20 dias de tratamento com lesões. B: Lesão aberta na articulação úmero-rádio-ulna semelhante a calo de decúbito. C: Lesão aberta na região cárpica e metarcáptica falageana. D: 30 dias de tratamento, e Shwiro sem apresentar lesão.

Figura 46 – Evolução clínica da paciente Megg.



Fonte: A autora (2021)

Legenda: A: antes do tratamento com alopecia e hipotricose; B: redução das áreas de alopecia; C: melhora clínica após 30 dias do início do tratamento.

Baseado nos critérios da classificação clínica da leishmaniose visceral canina em assintomático (sem sinais clínicos) e sintomáticos (com sinais clínicos), os quais são divididos em: polissintomáticos (acima de três sinais clínicos) e oligossintomáticos (entre um e três sinais clínicos) foram analisados os *status* clínicos dos cães tratados. Observou-se que os animais do grupo exposto eram 40% (2/5) assintomáticos (Figura 47A-B) e 60% oligossintomático com sinais inespecíficos (Quadro 2).

Quadro 2 - Alterações clínicas identificadas durante o monitoramento do grupo exposto

Animais expostos	Evolução clínica					
	Dia 0	Status	20 dias	Status	30 dias	Status
Bradock	Sem alteração	Assintomático	Vômito Perda de peso	Oligossintomático	Sem alteração	Assintomático
Martinho	Alopecia Hipotricose	Oligossintomático	Alopecia Hipotricose	Oligossintomático	Sem alteração	Assintomático
Ney	Hipotricose	Oligossintomático	Hipotricose	Oligossintomático	Sem alteração	Assintomático
Ivete	Assintomático	Oligossintomático	Úlceras abertas	Oligossintomático	Sem alteração	Assintomáticos
Lili	Lesão na orelha	Oligossintomático	Aumento de lesão	Oligossintomático	Fechamento da lesão	Oligossintomático

Fonte: A autora, 2021

Figura 47 – Evolução clínica do paciente Bradock.

Fonte: A autora, 2021

Legenda: A: ao final do tratamento permaneceu assintomático imagem lateral. B: imagem frontal

Observou-se no grupo infectado (Quadro 3) que 100% dos casos estão relacionados a problemas de pele. É possível observar que 60% dos animais mudaram o *status* para assintomáticos devido ao restabelecimento da pele de forma progressiva. Porém, animais com úlceras cicatrizadas, após 20 dias de tratamento tiveram reabertura das lesões em 60% dos casos e aos 30 dias voltaram a cicatrizar. Na literatura não foram identificados estudos que mencionem piora clínica neste intervalo de tempo. Assim, 60% apresentaram melhora clínica e 40% ficaram oligossintomáticos.

Os doentes apresentaram como sinal clínico mais frequente e permanente a onicogribose com 80% dos casos do grupo doente (Quadro 4). A melhora não foi observada no presente estudo, possivelmente devido a permanência do parasito em níveis expressivos de DNA detectado na qPCR deste grupo no sangue (Gráfico 2).

Quadro 3 - Alterações clínicas identificadas durante o monitoramento do grupo infectado

Animais Infectados	Evolução clínica					
	Dia 0	Status	20 dias	Status	30 dias	Status
Shwiro	Lesões fechadas	Assintomático	Úlceras abertas	Oligossintomático	Sem alteração	Assintomáticos
Pipa	Onicogribose Lesões fechadas	Oligossintomático	Onicogribose Lesões abertas	Oligossintomático	Lesões fechadas Onicogribose	Oligossintomático
Belinha	Onicogribose Lesões fechadas	Oligossintomático	Úlceras abertas	Oligossintomático	Sem alteração	Assintomáticos
Raposa	Hipotricose	Oligossintomático	Hipotricose	Oligossintomático	Sem alteração	Assintomáticos
Megg	Ceratoconjuntivite Hipotricose Alopecia	Oligossintomático	+Secreção ocular Flebite Esclerite	Polissintomático	Esclerite Onicogribose	Oligossintomático

Fonte: A autora, 2021

Quadro 4 - Alterações clínicas identificadas durante o monitoramento do grupo doente

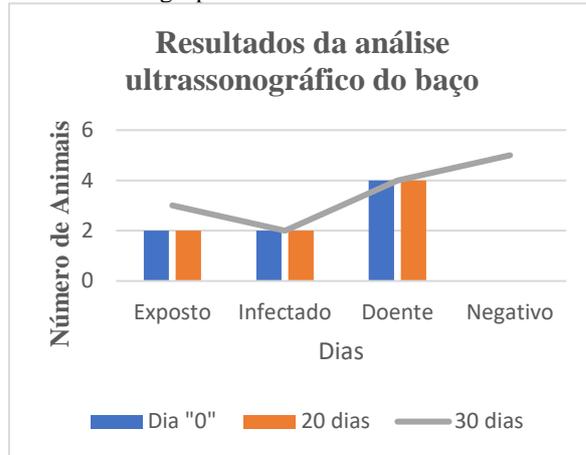
Animais Doentes	Evolução Clínica					
	Dia 0	Status	20 dias	Status	30 dias	Status
Dani Bondi	Úlceras aberta Alopecia	Oligossintomático	Úlceras abertas	Oligossintomático	Úlcera aberta	Assintomático
Tibílico	Onicogribose Hipotricose	Oligossintomático	Onicogribose Hipotricose	Oligossintomático	Onicogribose	Oligossintomático
Angélica	Esplenomegalia Anorexia Onicogribose	Oligossintomático	Esplenomegalia Anorexia onicogribose	Oligossintomático	Esplenomegalia Anorexia onicogribose	Oligossintomático
Galo	Onicogribose	Oligossintomático	Onicogribose	Oligossintomático	Onicogribose	Oligossintomático
Linda Jones	Onicogribose Alopecia	Oligossintomático	Onicogribose Áreas de alopecia	Oligossintomático	Onicogribose	Oligossintomático

Fonte: A autora, 2021

9.4 Resultados da análise ultrassonográfica dos animais

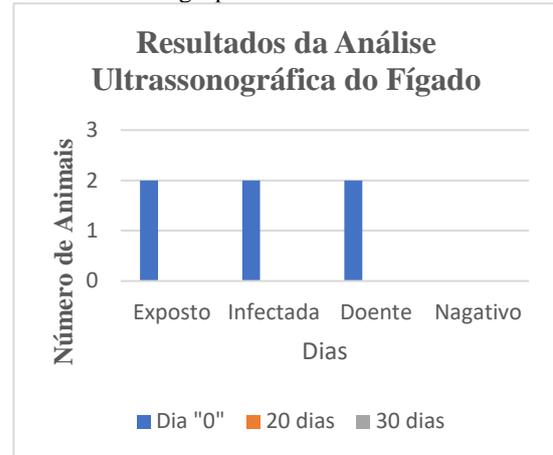
Fazendo a análise das alterações ultrassonográficas observou-se que 80%, 20% e 20% dos cães pertencentes aos grupos doentes, expostos e infectados, respectivamente, apresentaram esplenomegalia até os 30 dias após o início do tratamento (Gráfico 3). Foi possível verificar, ainda, que um animal do grupo infectado apresentou associado a esplenomegalia a presença de nódulos esplênicos com redução significativa dos nódulos após o tratamento, porém sem redução do tamanho do órgão (Figuras 48 e 49). A hepatomegalia foi verificada em 20% dos animais de cada um dos grupos tratados, porém com retorno ao tamanho normal ao final do tratamento em todos os grupos (Gráfico 4).

Gráfico 3 - Valores absolutos obtidos após análise ultrassonográfica esplênica em cães nos diferentes grupos



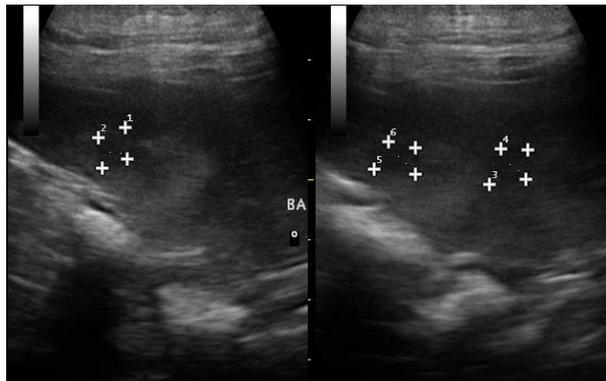
Fonte: A autora, 2021

Gráfico 4 - Valores absolutos obtidos após análise ultrassonográfica hepática em cães nos diferentes grupos



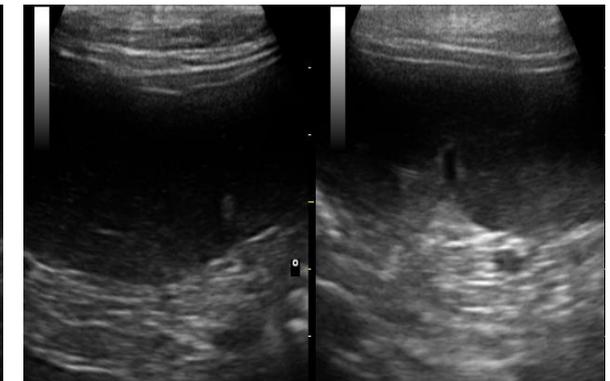
Fonte: A autora, 2021

Figura 48 - Esplenomegalia com presença de nódulos



Fonte: Oliveira *et al.* (2021)

Figura 49 - Baço com ausência de nódulos ao final do tratamento



Fonte: Oliveira *et al.* (2021)

9.5 Resultados da análise hematológica dos animais antes, durante e logo após o tratamento

Todos os cães avaliados apresentaram anemia, sendo a mais frequente a anemia normocítica normocrômica (Tabelas 5). A série vermelha é uma das primeiras que sofrem alterações nos animais diagnosticados com LVC. O grupo doente (G1) apresentou diminuição no número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, após o tratamento (Tabela 5) permanecendo com anemia normocítica normocrômica ao final do estudo. Os Animais do grupo infectado (G2) voltaram ao valor de referência de eritrócitos aos 20 dias de tratamento sugerindo reposta ao efeito leishmanicida da miltefosina (Tabela 5), porém aos 30 dias voltaram a apresentar anemia normocítica, sendo nesta última análise com hipocromia (Tabela 5). O grupo exposto (G3) caracterizado pela ausência do parasito em níveis detectáveis, restabeleceram o quadro de normalidade da série vermelha com eritrócitos dentro do valor de referência (Tabela 5). A série vermelha é uma das primeiras que sofrem alterações, como visto

neste estudo. Os animais doentes apresentaram diminuição no número de hemácias e do hematócrito, mesmo após o tratamento. Animais infectados e expostos apesar de apresentarem uma média inferior aos valores de referência desses dois parâmetros, mostraram um discreto aumento dos valores após o tratamento, porém sem mudar a condição de anemia.

Tabela 5 - Análise das médias e desvio padrão dos valores hematológicos obtidos entre os diferentes grupos em cada tempo de tratamento com miltefosina 2%.

Parâmetros hematológicos/ Valor de referência	Análise dia 0			Análise dia 20			Análise dia 30		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Eritrócitos (mil/mm ³) 5,5 - 8,5	4,62 ^f ±0,85 ^e	5,27 ^f ±0,75 ^e	4,90 ^f ±1,23 ^e	3,67 ^f ±1,17 ^{bc}	5,62 ^f ±0,88 ^{ac}	5,02 ^f ±1,15 ^{abc}	3,79 ^f ±1,11 ^{bc}	5,71 ^f ±0,98 ^{ac}	5,12 ^f ±0,71 ^{ac}
Hemoglobina g/dL 12,0 - 18,0	8,58 ^f ±2,28 ^e	12,28 ^f ±1,74 ^e	11,12 ^f ±2,78 ^e	7,94 ^f ±2,39 ^{bc}	12,82 ^f ±1,82 ^{ac}	11,34 ^f ±2,61 ^{abc}	8,24 ^f ±2,24 ^{bc}	14,34 ^f ±3,64 ^{ac}	11,38 ^f ±1,61 ^{abc}
Hematócrito (%) 38 - 47	25,60 ^f ±6,94 ^e	36,30 ^f ±5,50 ^e	32,22 ^f ±7,93 ^e	23,80 ^f ±6,97 ^{bc}	37,00 ^f ±9,19 ^{ac}	32,48 ^f ±7,76 ^{bc}	23,92 ^f ±6,19 ^{bc}	37,14 ^f ±6,08 ^{ac}	32,98 ^f ±5,12 ^{abc}
VGM (μ ³) 63 - 77	64,20 ^f ±1,64 ^e	68,80 ^f ±8,19 ^e	65,40 ^f ±2,88 ^e	65,40 ^f ±2,85 ^e	67,04 ^f ±2,93 ^e	66,02 ^f ±3,19 ^e	64,46 ^f ±2,70 ^e	63,74 ^f ±1,53 ^e	65,02 ^f ±2,14 ^e
CHCM (g/dL) 31 - 35	30,66 ^f ±5,56 ^e	30,16 ^f ±6,62 ^e	31,92 ^f ±5,46 ^e	33,16 ^f ±1,86 ^e	31,2 ^f ±3,93 ^e	33,9 ^f ±2,19 ⁴	34,08 ^f ±1,09 ^e	30,06 ^f ±6,41 ^e	28,62 ^f ±5,89 ^e
Plaquetas (mil/mm ³) 200 - 500	168,84 ^f ±116,22 ^e	325,97 ^f ±115,57 ^e	303,52 ^f ±86,03 ^e	216,19 ^f ±148,89 ^e	333,28 ^f ±50,57 ^e	297,88 ^f ±91,18 ^e	180,16 ^f ±128,67 ^e	183,60 ^f ±85,01 ^e	262,18 ^f ±58,55 ^e

Fonte: A autora, 2021

Legenda: Letras diferentes na mesma linha em cada grupo indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tempos estudados, através do teste de Student Newman-Keuls (SNK).

Quando a análise estatística é realizada em diferentes tempos dentro de cada grupo, não é possível verificar significância estatística. Os valores são muito semelhantes quando analisados entre indivíduos semelhantes. Não sendo observado melhora relevante após iniciado o tratamento dentro de cada grupo no que se refere a série vermelha. Foi observado trombocitopenia crescente nos valores plaquetários, com redução significativa no número de plaquetas após o início do tratamento, conforme tabela 6.

Tabela 6 - Análise das médias e desvio padrão dos valores hematológicos obtidos nos diferentes tempos de cada um dos grupos tratados com de miltefosina 2%.

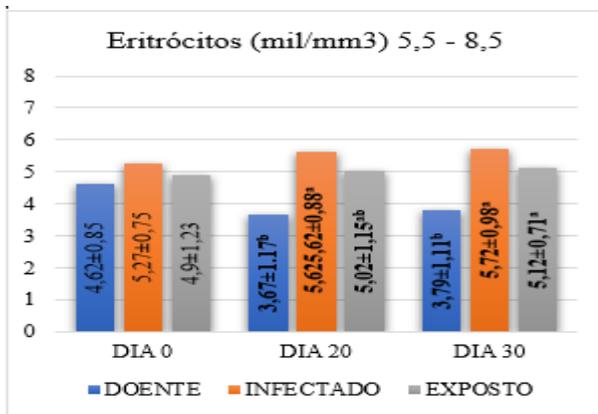
Parâmetros hematológicos/ Valor de referência	G1			G2			G3		
	dia 0	dia 20	dia 30	dia 0	dia 20	dia 30	dia 0	dia 20	dia 30
Eritrócitos (mil/mm ³) 5,5 - 8,5	4,62±0,85	3,67±1,17	3,79±1,11	5,27±0,75	5,62±0,88	5,71±0,98	4,90±1,23	5,02±1,15	5,12±0,71
Hemoglobina g/dL 12,0 - 18,0	8,58±2,28	7,94±2,39	8,24±2,24	12,28±1,74	12,82±1,82	14,34±2,64	11,12±2,78	11,34±2,61	11,38±1,61
Hematócrito (%) 38 - 47	25,60±6,94	23,80±6,97	23,92±6,19	36,30±5,50	37,00±9,19	37,14±6,08	32,22±7,93	32,48±7,76	32,98±5,12
VGM (μ ³) 63 - 77	64,20±1,64	65,40±2,85	64,46±2,70	68,80±8,19	67,04±2,93	63,74±1,53	65,40±2,88	66,02±3,19	65,02±2,14
CHCM (g/dL) 31 - 35	30,66±5,56	33,16±1,86	34,08±1,09	30,16±6,62	31,26±3,93	30,06±6,41	31,92±5,46	33,92±1,94	28,62±5,89
Plaquetas (mil/mm ³) 200 - 500	168,84±116,22	216,19±148,89	180,16±128,67	325,97±115,57a	333,28±50,57a	183,60±85,01b	303,52±86,03	297,88±91,18	262,18±58,55

Fonte: A autora, 2021

Legenda: Letras diferentes na mesma linha em cada momento avaliado indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos estudados, através do teste de Student Newman-Keuls (SNK).

Quando associados os valores dos eritrócitos (Gráfico 5) aos das plaquetas (Gráfico 6), e hemoglobina é possível atestar e prever sobre a gravidade da enfermidade. Neste estudo foi observado uma resposta estatisticamente significativa após o início do tratamento em todos os grupos com o aumento dos eritrócitos. Apesar de não ter sido observado significância estatística quanto aos valores plaquetários entre os grupos, foi possível verificar um aumento de plaquetas, acompanhando o número de eritrócitos. Porém, aos 30 dias, é verificada a trombocitopenia nos grupos doente e infectado e uma redução das plaquetas no grupo exposto. Apesar disto, nenhum sinal clínico de hemorragia foi detectado nos animais examinados.

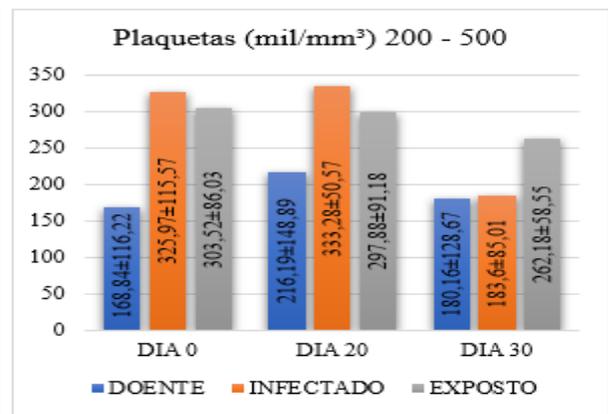
Gráfico 5 - Valores médios de eritrócitos comparados entre grupos nos diferentes tempos



Fonte: A autora, 2021

Legenda: A presença de letras diferentes no mesmo dia analisado indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados, através do teste de SNK.

Gráfico 6 - Valores médios de plaquetas comparados entre grupos nos diferentes tempos



Fonte: A autora, 2021

Legenda: A presença de letras diferentes no mesmo dia analisado indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados, através do teste de SNK.

Tabela 7 - Valores da média e desvio padrão da série leucocitária em diferentes tempos de cada grupo tratado com milfosina 2% nas diferentes fases clínicas

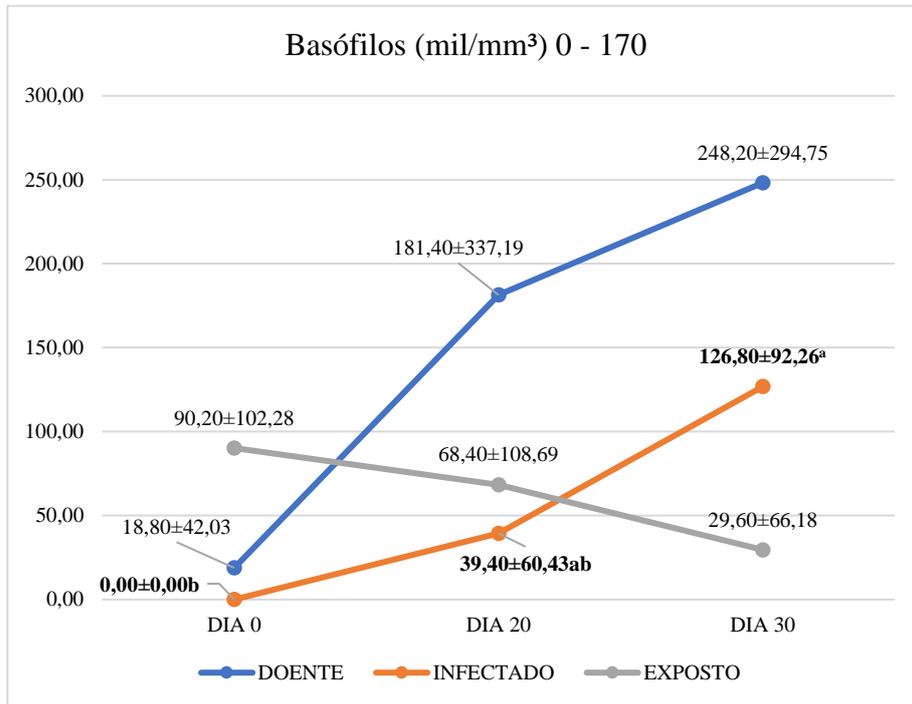
Parâmetros dos leucócitos/ Valor de referência	Doente(G1)				Infectado(G2)				Exposto(G3)			
	0	20	30	p	0	20	30	p	0	20	30	p
Leucócitos (mil/mm ³) 6.000-17.000	7,42± 2,60	9,10± 3,18	10,40± 7,60	0,6482	9,14± 5,82	9,06±3,94	7,67±2 ,39	0,8335	12,44± 3,64	11,94±3,1 5	11,86± 3,36	0,9592
Basófilo (mil/mm ³) 0-170	18,80± 42,03	181,40 ± 337,19	248,20 ± 294,75	0,3859	0,00± 0,00b	39,40±60, 43ab	126,80 ± 92,26a	0,0237	90,20± 102,28	68,40±10 8,69	29,60± 66,18	0,6017
Segmentados (mil/mm ³) 3.600-13.090	4.971,20± 2.056,75	6.710, 80± 3.369, 66	7.215, 40± 5.244, 88	0,6287	6.736, 80± 5.559, 73	6.296,40± 4.106,77	5.071, 00± 2.149, 22	0,8109	8.469, 60±4,9 81,47	7.415,80± 3.704,40	7.713,20± 3.968,09	0,9222
Bastonete (mil/mm ³) 0-510	0,00± 0,00	0,00± 0,00	47,40± 105,98	0,3966	84,00± 83,73	2,60± 5,81	131,20 ± 260,10	0,4517	0,00±0 ,00	102,40±2 28,97	0,00±0,00	0,3966
Eosinófilos (mil/mm ³) 120-1.700	80,00± 115,85	299,40 ± 327,27	748,60 ±1.224 ,28	0,3717	243,00 ± 287,54	497,80± 409,20	699,40 ± 411,64	0,1963	646,60 ±205,0 7	747,40±5 41,94	798,00± 423,12	0,8431
Linfócitos (mil/mm ³) 720-5.100	4.208,60± 2.636,46	3.757, 20± 2.654, 37	2.752± 1.466, 10	0,6096	3.180, 60± 3.335, 58	3.405,40± 3.646,75	3.245, 60± 3.208, 95	0,9942	4.386, 00±2,3 84,69	4.156,40± 1.735,54	3.095,00± 990,48	0,4999
Monócito (mil/mm ³) 180-1.700	596,20±4 89,74	473,40 ± 335,35	207,20 ±103,0 2	0,2356	446,20 ± 577,72	461,40± 584,25	242,40 ± 251,75	0,7436	189,80 ±222,6 9	561,40±6 73,84	345,20± 257,77	0,4262

Fonte: A autora, 2021

Legenda: Letras diferentes na mesma linha em cada momento avaliado indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos estudados, através do teste de Student Newman-Keuls (SNK).

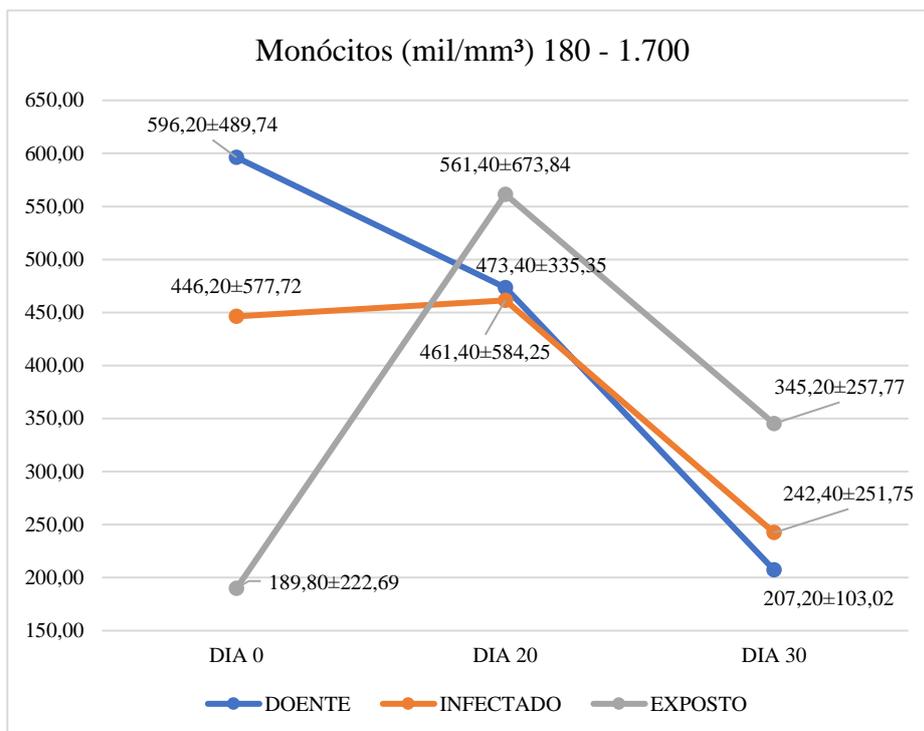
A série branca na resposta imune é alterada com o aumento do número de células envolvidas inicialmente na resposta inata e subsequentemente na resposta adaptativa. Neste estudo foram observados na análise do grupo G2 uma significância estatística relevante quanto a produção do número de basófilos (Tabela 7) responsável pela liberação de IL-4 induzindo a resposta Th2 relacionada a progressão da doença.

O G1 também mostrou aumento no número de basófilos caracterizando uma basofilia, porém sem significância estatística. O G2 apresentou no número de basófilos após início do tratamento com significância estatística (Gráfico 7) e diminuição de monócitos ao final dos 30 dias (Gráfico 8). O G3 ao contrário dos outros grupos teve uma redução dos basófilos corroborando com as características do grupo que tendem a resistência a doença, portanto apresentado um perfil Th1 com presença crescente de monócitos após o tratamento comparada ao dia “0”. Os demais parâmetros não apresentaram diferença significativa ou aumento relacionado a relação imunológica de progressão e resistência a doença.

Gráfico 7 - Basófilos com significância estatística entre os diferentes tempos

Fonte: A autora, 2021

Legenda: A presença de letras diferentes na mesma linha (grupo) indica diferença significativa ($P < 0,05$) os dias analisados, através do teste de Student Newman-Keuls (SNK).

Gráfico 8 - Monócito nos diferentes tempos entre os grupos

Fonte: A autora, 2021

Legenda: A presença de letras diferentes na mesma linha (grupo) indica diferença significativa ($P < 0,05$) os dias analisados, através do teste de Student Newman-Keuls (SNK).

9.6 Resultados da análise bioquímica dos animais antes e após o tratamento

Os resultados bioquímicos referentes a enzima Alanina aminotransferase (ALT) estão contidos na tabela 8. Os animais dos grupos doentes e infectados que apresentaram altas taxas antes do tratamento, responderam positivamente com a redução dessa enzima na primeira e última análise após início do tratamento. Os resultados são ratificados pelos dados ultrassonográficos observados no gráfico 4.

Os valores de ureia se apresentaram superiores aos valores de referência no grupo doente 20 dias após o início do tratamento e se elevou ainda mais ao final do tratamento. Os níveis de ureia observados nos animais na condição de sintomático ou doente, podem aumentar ainda mais quando os animais são tratados levando a quadros graves da doença.

A hiperproteinemia, observada em todos os grupos tratados corrobora com os níveis de anticorpos observados neste estudo nas tabelas 1, 2 e 3, bem como nos resultados alterados nos níveis de globulinas observados na tabela 8.

Tabela 8 - Monitoramento com médias \pm desvio padrão dos parâmetros bioquímicos observados nos diferentes tempos em cada grupo tratado com miltefosina 2%.

Parâmetros / Valor de referência	Doente(G1)			Infectado(G2)			Exposto(G3)		
	Dia 0	Dia 20	Dia 30	Dia 0	Dia 20	Dia 30	Dia 0	Dia 20	Dia 30
Proteína Total g/dL	8,80 \pm 1,36	8,82 \pm 1,09	9,34 \pm 1,43	7,66 \pm 2,32	9,14 \pm 1,39	9,36 \pm 1,44	7,14 \pm 2,63	8,68 \pm 0,80	8,62 \pm 0,78
Albumina g/dL	2,10 \pm 0,77	2,44 \pm 0,63	2,13 \pm 0,61	2,77 \pm 0,22	2,85 \pm 0,62	2,69 \pm 0,22	2,44 \pm 0,54	2,45 \pm 0,59	2,45 \pm 0,83
T.G.P. (A.L.T.) U.I./L	110,80 \pm 121,85	51,40 \pm 29,68	38,80 \pm 16,72	99,20 \pm 116,94	86,60 \pm 117,36	81,20 \pm 88,92	24,20 \pm 15,83	28,40 \pm 12,15	20,20 \pm 3,89
Ureia mg/L	60,60 \pm 41,76	56,60 \pm 26,08	94,00 \pm 100,64	38,40 \pm 11,76	36,80 \pm 13,97	37,60 \pm 4,66	43,40 \pm 15,53	42,80 \pm 21,85	47,20 \pm 26,45
Creatinina mg/dL	1,34 \pm 0,46	1,30 \pm 0,43	1,35 \pm 0,74	1,08 \pm 0,35	1,24 \pm 0,20	1,48 \pm 0,27	1,01 \pm 0,40	1,26 \pm 0,35	1,32 \pm 0,55
Fosfatase Alcalina U.I./L	119,36 \pm 130,09	85,00 \pm 79,46	66,76 \pm 62,23	53,88 \pm 12,05	73,80 \pm 31,16	76,10 \pm 24,55	57,62 \pm 17,30	64,74 \pm 25,55	65,90 \pm 28,85

Fonte: A autora, 2021

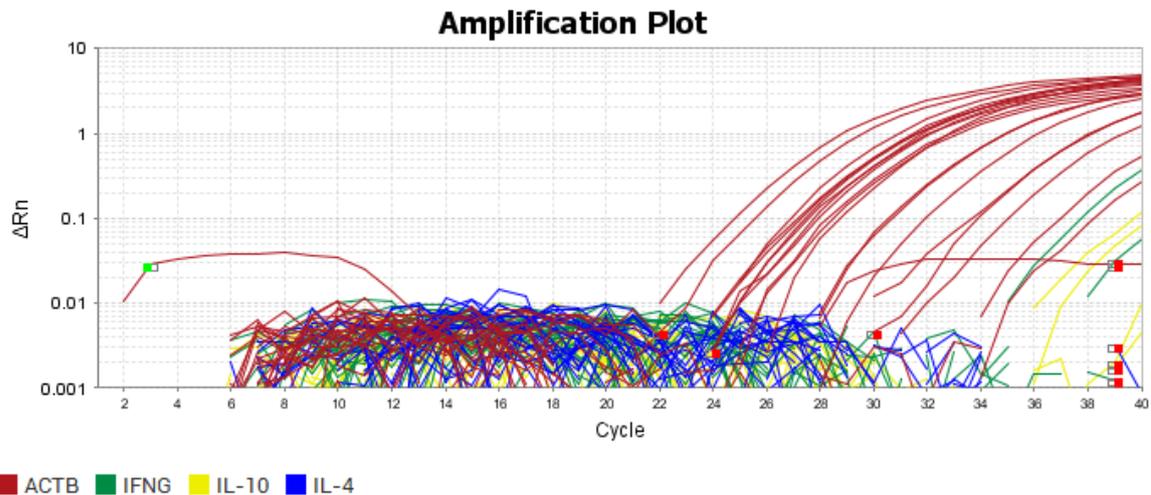
Legenda: Letras diferentes na mesma linha em cada grupo indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tempos estudados, através do teste de Student Newman-Keuls (SNK).

9.7 Resultados da Expressão gênica

Não foi amplificada nenhuma das citocinas analisadas em nenhum dos tempos propostos (Figura 50) para verificação da conversão do perfil Th2 para Th1. Contudo, o controle endógeno, a β -Actina amplificou em todas as amostras analisadas demonstrando que a reação foi bem-sucedida. Não foi possível realizar a quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A quantificação relativa que seria dada pela razão entre os valores médios de CT (limiar do ciclo) dos genes alvo e o genes de referência (β -actina) não foi possível por não ter expressão detectável dos genes alvos, visto que não houve amplificação como observado na figura 51.

Apesar de não conseguirmos observar tais resultados por meio da expressão gênica, conseguimos fazer uma relação por meio da análise das células produtoras de IL-4, no caso os basófilos e produtoras de IFN- γ , no caso os monócitos e então associamos aos níveis de IgG onde conseguimos dar um prognóstico semelhante ao encontrado por outros autores. com aumento de monócitos e diminuição de basófilos. Porém, em animais doentes não verificamos tal resultado, pois os basófilos continuaram aumentado e os monócitos diminuindo, especialmente no grupo infectado com baixa carga parasitárias e menor nível de IgG quando comparado ao grupo doente. Contudo, serão feitas novas análises de expressão gênica das citocinas a fim de comparar e até ratificar os dados celulares encontrados no estudo.

Figura 51 - Resultado da qPCR ilustrando a amplificação da curva do gene endógeno e a não amplificação ou ruídos dos genes alvos analisados



Fonte: A autora, 2021

10 DISCUSSÃO

Segundo estudo realizado por Solano-Gallego *et al.* (2016) em cães com *status* clínico de moderado e grave que correspondem respectivamente aos grupos infectado e doente deste estudo, mostraram a redução precoce dos níveis de anticorpos específicos utilizando o ELISA após 30 dias do início do tratamento. Apesar da comparação entre os diferentes estudos ser difícil, devido a variedade na condição clínica de cada animal (TRAVI *et al.*, 2018), foi possível comparar devido a semelhança na classificação clínica e no método sorológico de monitoramento utilizado por Solano-Gallego *et al.* (2016).

Contudo, os resultados do ELISA encontrados no nosso estudo ratificam os achados de Ferrer *et al.* (1995) que monitoraram 25 cães infectados naturalmente e tratados com N-metilglucamina e alopurinol utilizando o ELISA para detecção de anticorpos, concluindo que o referido teste não é indicado no monitoramento de animais em tratamento visto que 15 animais permaneciam com títulos altos e em alguns casos iguais ao do dia do diagnóstico.

Diferenças sorológicas quanto ao tempo de identificação de anticorpos foram relatadas por Silveira *et al.* (2021) em um estudo de casos realizado em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, onde os autores atribuíram tais achados as peculiaridades de cada animal e aos testes sorológicos por não terem 100% de sensibilidade podendo falhar no período pré-patente, corroborando com o presente estudo que utilizou animais expostos e em tratamento.

Animais infectados, possuem uma quantidade menor de anticorpos quando comparados aos animais na classificação de doente, no que se refere aos testes sorológicos (PALTRINIERI *et al.*, 2010). Apesar disto, a detecção das imunoglobulinas em animais sintomáticos, mesmo em alguns testes onde a sensibilidade não seja tão alta é mais fácil do que em animais expostos. Tal informação é ratificada nos estudos de Silva *et al.* (2014) que identificaram um percentual maior de positivos no grupo sintomático utilizando o ELISA chegando a 72%, e no RIFI 69%. Porém, o mesmo estudo observa que no caso de animais assintomáticos o inverso foi verdadeiro, visto que animais assintomáticos foram 50% positivos ao teste de RIFI e apenas 34% no ELISA. Diante desses resultados os autores sugerem a aplicação de mais de um método de diagnóstico.

Um outro estudo realizado por Silva *et al.* (2016) observaram que os resultados do DPP variaram conforme o quadro clínico do animal onde eles obtiveram 88,9% em cães sintomáticos, 52,4% em animais oligossintomáticos e de 12% em assintomáticos. Os resultados de Silva *et al.* (2016) discordam dos encontrados neste estudo que obteve 100% de positividade nas amostras de sangue dos animais oligossintomáticos do grupo de infectado tanto antes,

quanto durante e após o tratamento sugerindo a utilização dele no monitoramento da enfermidade. A RIFI apesar de utilizar antígeno bruto das formas promastigotas de *L. major*-like, apresentou baixo índice de falsos positivos, apresentando uma especificidade de 99,37% e sensibilidade de 85,11% nos estudos realizados por Silva *et al.* (2016). Porém, resultados negativos ao RIFI podem confundir o médico veterinário e ausentar o tutor de métodos preventivos.

Animais doentes apresentam mais anticorpos quando comparados a animais infectados ou expostos apresentando altas titulações nos testes sorológicos (PALTRINIERI *et al.*, 2010). Animais submetidos ao RIFI podem ter falsos negativos em indivíduos sintomáticos quando comparado ao ELISA como mostra os resultados de Silva *et al.* (2014) ou quando comparado ao DPP como mostra os resultados de Silva *et al.* (2016). Os estudos citados corroboram com os resultados deste estudo que obteve um percentual de positividade menor em indivíduos sintomáticos submetidos ao RIFI.

A carga parasitária de animais tratados foi analisada por Manna *et al.* (2008) que utilizaram a miltefosina 2% 1mL/10Kg/dia por 30 dias. A avaliação feita pelos autores foi de 2 meses após o tratamento com miltefosina. Os autores também observaram uma redução progressiva, porém com aumento da carga parasitária de 2 animais dentro de um grupo de 18 cães conforme figura 45 ilustrado por Manna *et al.* (2008). Os dados são divergentes no que tange a não detecção de DNA após o tratamento, visto que tal situação não foi detectada no trabalho dos referidos autores. Fatores como o tempo podem ter influenciado nas divergências entre os dados deste estudo e dos encontrados por Manna *et al.* (2008). Além disso, a comparação entre os diferentes estudos é difícil devido a variedade na condição clínica de cada animal (TRAVI *et al.*, 2018).

A análise durante o período de tratamento foi verificada na literatura apenas com o mínimo de 2 semanas de intervalo entre cada observação e após o tratamento. Estudos recentes mostraram que 94,2% dos cães tratados com miltefosina 2% por quatro semanas (28 dias) obtiveram melhora clínica progressiva no início chamada de semana 0, cujo percentual de melhora foi de 16.29 ± 7.57 , com duas semanas, com percentual de 15.26 ± 7.45 , e pós o tratamento na quarta semana, com 12.14 ± 5.31 (NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Figueiredo *et al.* (2014) afirma, após analisar 435 cães no estado do Pará, que os sinais clínicos mais frequentes em cães com leishmaniose visceral são as alterações cutâneas e a onicogribose. Segundo Schimming (2012) esses sinais podem aparecer sem estar associado a nenhum outro sinal específicos da doença. Ainda animais sorologicamente positivos serem

assintomáticos como relatado por Andrade *et al.* (2011) que encontrou apenas 1 animal assintomático dentre os 14 estudados.

Andrade *et al.* (2011) também analisando o uso da miltefosina em cães, verificaram que apenas 50% obtiveram melhora clínica e 21,44% ficaram oligossintomático. Os mesmos autores ainda corroboram com este estudo ao identificar que os sinais clínicos mais frequentes foram as dermatites com 61,5%. Bertolo (2017) em um estudo específico sobre a onicogrifose, cita este sinal clínico como sendo um dos principais achados e um dos mais frequentes na LVC, corroborando com o nosso estudo, e os estudo de Figueiredo *et al.* (2014) e Andrade *et al.* (2011). Apesar dos autores não falarem sobre a permanência deste sinal clínico é possível inferir que houve melhora da onicogrifose nos estudos de Andrade *et al.* (2011), visto que 50% dos cães tiveram cura clínica e que 53,8% apresentaram onicogrifose.

A esplenomegalia é um sinal frequente e pode estar associada a uma infinidade de enfermidade (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Um estudo feito por Aguiar *et al.* (2007) em animais positivos ao ELISA e parasitológico para LVC, mostraram que a esplenomegalia é o terceiro achado mais frequente, sendo o primeiro a alteração de pele e o segundo alterações oftalmológicas. Um outro estudo realizado por Oliveira (2018) mostrou que 73,9 % dos animais estudados, utilizando a ultrassonografia, apresentaram esplenomegalia, porém com estruturas preservadas e sem o relato de nódulos.

Não foi identificado nenhum estudo sobre a regressão do baço após o uso da miltefosina. Sabe-se que ação do parasita através da imunossupressão provoca um desarranjo na polpa branca esplênica com redução dos folículos linfoides e menor número de células T CD4+ o que provoca alteração morfofisiológica nos cães infectados por *L. infantum* (SILVA *et al.*, 2018). Corroborando com os achados ultrassonográficos, parasitológicos e sorológicos do presente estudo. Os nossos resultados diferem dos achados de Giunchetti *et al.* (2008) quanto a frequência da hepatomegalia nos cães dos grupos sintomático, oligossintomático e assintomático, no qual eles observaram 94,1%, 66,7% e 8,3%, respectivamente. Os resultados podem divergir pelo método de diagnóstico utilizado, e pela classificação dos grupos.

A anemia normocítica normocrômica é descrita por Braz *et al.* (2018) que além ratificar os achados atribui a estes fatores como hipoplasia ou aplasia medular ou ainda hemorragias e processo inflamatórios. A trombocitopenia é considerada um achado frequente entre os autores, sendo atribuído ao sequestro de plaquetas, diminuição ou pouca produção de megacariócitos e plaquetas (Ulchar *et al.* 2015), e por reações imunomediadas sendo presente especialmente em animais do grupo doente (Paltrinieri *et al.*, 2016).

Um estudo realizado por Braz *et al.* (2018) relatou uma frequência de trombocitopenia de 82,3%, e após o tratamento com miltefosina os dados não se modificam. Outro estudo comparativo realizado por Dias *et al.* (2020) mostra uma redução no número de plaquetas após 29 dias de tratamento passando de 195,73 (mil/mm³) no dia “0” para 189,13 (mil/mm³) aos 29 dias. Por outro lado, Santos, Ribeiro e Conti (2020) observaram uma redução de 60% para 30% da trombocitopenia após o tratamento.

A série branca é constantemente relacionada a neutrofilia, sendo considerado um achado frequente por Maia e Campino (2018). Os mesmos autores consideram pouco comum a monocitose, linfopenia, eosinopenia e leucopenia. Porém, quando se trata do número de basófilos alguns artigos incluem essas células dentro das granulocíticas (REIS *et al.*, 2006), outros nem mencionam como Dias *et al.* (2020) e Smalbroek (2021). Existem, ainda, os que avaliam utilizando valores relativos, como Braz *et al.* (2015). Esses dados corroboram com os estudos de Karasuyama *et al.* (2021) sobre como o basófilo é uma célula tão importante e ao mesmo tempo tão negligenciada ao longo dos anos. Os autores ainda descrevem os avanços nos estudos com os basófilos em animais e destaca o seu importante papel na resposta imunológica.

Nas análises bioquímicas de animais com LVC há divergência entre autores, Mateo *et al.* (2009), por exemplo, fazendo análise da miltefosina no dia zero e 49 dias após o tratamento não observaram melhora, inclusive com valores dentro da normalidade, sendo 38,93 UI L⁻¹ antes do tratamento e 38,07 UI L⁻¹ após o tratamento. E divergente de Santos *et al.* (2020) que também obteve em seus estudos no dia zero animais dentro da normalidade com 44,43 UI L⁻¹ e com 28 dias de tratamento 55,29 UI L⁻¹. Tais resultados se assemelham apenas ao final do tratamento no grupo doente. A divergência nos dados se dá provavelmente por falta de seleção de grupos clínicos pré-estabelecidos, visto que ao comparar com animais doentes os resultados se assemelham discretamente aos do presente estudo.

As contradições observadas nos valores de ureia ocorreram possivelmente pela peculiaridade de resposta e o *status* clínico de cada animal. É possível observar que animais doentes ou sintomático apresentam maiores níveis de ureia. Santos *et al.* (2020) verificaram uma diminuição nos níveis de ureia após o tratamento com redução de 53,06 para 29,16. No estudo realizado por Mateo *et al.* (2009), os cães permaneceram com níveis de ureia próximo aos valores antes do tratamento, sendo os valores de 0,42 no início e de 0,43 ao final do tratamento. Vieira-Neto *et al.* (2011) também observaram em seus resultados que animais sintomáticos apresentaram valores superiores aos animais assintomáticos.

O aumento da proteína e da globulina estão ligados a resposta humoral do hospedeiro a *L. infantum* que leva ao aumento do número de linfócitos B e aumento da produção das

imunoglobulinas justificando o aumento da proteína e das globinas no sangue (AGUIAR *et al.*, 2007). Resultados semelhantes também foram encontrados por Mateo *et al.* (2009), onde os cães mantiveram os níveis de proteína total altos, mesmo após o tratamento. Contudo, diverge significativamente dos resultados de Santos *et al.* (2020) onde observaram os valores de proteína total reduzidos consideravelmente após o tratamento dos cães. A divergência entre os autores e o nosso estudo, se dá provavelmente pelos tempos da análise, e os valores iniciais obtidos por cada autor.

Com relação a expressão gênica, um estudo realizado por Andrade *et al.* (2011) em cães tratados com miltefosina, tiveram ao final do tratamento um aumento nos níveis de IFN γ e uma diminuição dos níveis de IL-4 e IL-10, mostrando uma resposta ao tratamento com uma mudança no perfil de resposta crescente de Th2 para Th1. O método utilizado pelos autores difere do presente estudo, que ao invés do ELISA utilizamos a RT-PCR para verificação da expressão gênica das citocinas. Contudo, Manna *et al.* (2008) utilizando a mesma técnica do nosso estudo, porém com sonda desenhadas por eles mesmos e utilizando a extração de RNA por cultura, conseguiram obter resultados da expressão com baixos níveis no início do tratamento de IFN- γ e níveis mais altos de IL-4, logo após 3 meses (T1) ocorre um aumento discreto de IFN- γ e diminuição de IL-4, o qual chega aos 6 meses com valores semelhantes de IFN- γ e IL-4 e aos 12 meses também da mesma forma e com baixa quantidade de DNA de leishmania no sangue e nos tecidos linfoides (linfonodo).

11 CONCLUSÕES

Os biomarcadores hematológicos caracterizados pelos valores eritrocitários, números absolutos de basófilos e monócitos associados ao monitoramento dos níveis de IgG detectado pela densidade óptica (D.O) de ELISA constituem bom marcadores preditivos da evolução da doença dos animais independente da classificação clínica de doente, infectado ou exposto.

O ELISA é uma boa ferramenta de monitoramento dos animais em tratamento com miltefosina 2%, especialmente quando associada a hematologia, bioquímica e a carga parasitária.

Animais tratados com miltefosina reduzem a carga parasitária consideravelmente, chegando em níveis indetectáveis na qPCR nos grupos expostos e infectados.

A melhora clínica está condicionada a classificação clínica dos animais tratados. Visto que animais expostos têm resposta melhor ao tratamento do que animais infectados e doentes.

Cães com alterações significativas na série vermelha e nas plaquetas não conseguem obter melhora, sugerindo que a medicação estudada não age positivamente na regeneração dessas células.

Em cães com alteração morfofisiológica do fígado a mediação mostrou capacidade regenerativa do órgão, demonstrada tanto na ultrassonografia quanto nos valores bioquímicos.

Os basófilos podem ser possíveis biomarcadores preditivos da resposta imune quando associado a outros testes, podendo dar um prognóstico da LVC em animais em tratamento com a miltefosina.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P. H. P. *et al.* Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v. 8, n.4, p. 283-294, 2007.
- AIRES, J. M. *et al.* Maxidilan (MAX) – Proteína salivar de *Lutzomyia longipalpis*: detecção de anticorpos antiMAX em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e expressão gênica e protéica de MAX e *Lutzomyia neivai**. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 333-338, 2005.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **Plos Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0004349, Mar. 2016.
- AKHOUNDI, M. *et al.* *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Mol. Aspects Med**, Elmsford, v. 57, p. 1-29, 2017.
- AKPUNARLIEVA, S.; BURCHMORE, R. The role of membrane transporters in *Leishmania* Virulence. **Emerg. Top. Life Sci.**, v. 1, p. 601–611, 2017.
- ALERTA EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE. Maceió: Secretaria do Estado de Saúde, n. 1, 2018.
- ANDRADE, H. M. *et al.* Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Vet. Parasitol.** Amsterdam, v. 181, n. 2-4, p. 83-90, 2011.
- ASSCHE, T. V. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radic. Biol.**, New York, v. 51, p. 37–351, 2011.
- AYRES, M. *et al.* **Bioestatística e Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: Ed. Sociedade Civil Mamirauá, 2007.
- BASTOS, M. M. *et al.* Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Rev. Virtual Quim.**, Niterói, v. 8, n. 6, p. 2072-2104, 2016. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/v8n6a21.pdf>. Acesso em: 24 jun 2018.
- BERTOLO, P. H. **Relação entre as lesões histológicas e a carga parasitária da região ungueal de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum***. 2017.41 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2017.
- BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders**: clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca, 1998.
- BOCHNAKIAN, M. S. *et al.* Lesões orais secundárias à leishmaniose visceral em um cão com hiperadrenocorticismismo endógeno: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.70, n.4, p.1115-1119, 2018.

BLAVIER, A. *et al.* Atypical Forms of Canine Leishmaniosis. **Vet. J.**, London, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.

BOGGIATTO, P. M. *et al.* Immunologic Indicators of Clinical Progression during Canine *Leishmania infantum* infection. **Clin. Vaccine Immunol.**, Washington, v. 17, n. 2, p. 267–273, Feb. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Nota técnica nº 01/2011/CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS.** Esclarecimento sobre substituição do protocolo de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Brasília, DF, 2011. Disponível em: http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc.pdf. Acesso em: 03 jun 2018

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Nota técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. **Autorizado o registro do produto milteforam, sob número SP 000175-9.000003, de propriedade da empresa Virbac Saúde Animal, indicado para o tratamento da leishmaniose visceral de cães.** 2016. Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>. Acesso em: 03 jun 2018

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de vigilância em Saúde.** Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2015/09/instru%C3%A7%C3%B5es-teste-rapido-Alere-LVC-manual.pdf>. Acesso em: 03 jun 2018

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: http://bvsm.sau.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerai_ledicao.pdf. Acesso em: 03 jun 2018

BRAZ, P. H. *et al.* Alterações da proteína C reativa e fator reumatoide em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro v.38, n.9, p. 1829-1833, 2018

BRODSKYN, C. I.; KAMHAWI, S. Biomarkers for zoonotic leishmaniasis visceral in Latin America. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, Lausanne, p.1-10, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00245/full>. Acesso em: 26 ago 2021

CASTELLANOS-GONZALEZ, A. *et al.* A Novel Molecular Test to Diagnose Canine Visceral Leishmaniasis at the Point of Care. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 93, n.5, p. 970-975, 2015.

CASTRO, R. S. *et al.*, Hepatic fibropoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* treated with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 250, p. 22–29, 2018.

CECCARELLI, M. *et al.* Detection and Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR GreenBased Real-Time PCR and High Resolution Melt

Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, p. 1-11, 2014.

CHAVES, M. M. *et al.* Avaliação do potencial reservatório do cão na Leishmaniose Visceral em dois municípios do Estado do Ceará. **PUBVET**, Maringá, v.7, n. 15, art. 1568, 2013.

CHUN-HUA, G. *et al.* Development of a LAMP assay for detection of *Leishmania infantum* infection in dogs using conjunctival swab samples. **Parasites Vectors**, London, v. 8, p. 1-8, 2015

CIARLINI, P. C. *et al.* Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o tratamento com antimoniato de meglumina e allopurinol. **Cienc. Anim. Bras.**, Goiás, v. 11, n. 2, p. 369-375, 2010. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/2149>. Acesso em: 26 ago 2021

CONTRERAS, I. K. *et al.* Sinais clínicos apresentados por cães positivos para leishmaniose visceral no município de Vassouras, Rio de Janeiro. **PUBVET**, Maringá, v.13, n.4, ano 302, p.1-6, abr., 2019.

CORTESE, L.; CHRISTOPHERSON, P.W.; PELAGALLI, A. Platelet Function and Therapeutic Applications in Dogs: Current Status and Future Prospects. **Animals (Basel)**, Basel, v. 10, n. 2, p. 201, 2020.

COSTA, S. F. *et al.* Eosinophilic inflammation in lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, Oxford, p. 1-6, 2018.

CUMMING, G.; FIDLER, F.; VAUX, D. Error bars in experimental biology. **J. Cell Biol.**, New York, v. 177, n. 1, p.–11, 2007.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n.1, p.117-118, 2006a.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Rev Saúde Pública**, v. 40, n. 3, p. 537-41, 2006b. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/NfZxPrYYSpSptfjXLYFd7zw/?lang=pt>. Acesso em: 26 ago 2021

DAY, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation, **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 147, p. 2-8, 2007.

DIAS, Á. F. L. R. *et al.* Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. **Exp Parasitol.**, New York, v.217, p.107947, 2020.

FALCÃO, S. A. C. *et al.* *Leishmania infantum* and *Leishmania brasiliensis*: diferensis and similarities to evade the innate immune system. **Front. Immunol.**, Switzerland, v. 7, p.1-10, 2016.

FERROGLIO, E. *et al.* Epidemiological evaluation of *Leishmania infantum* zoonotic transmission risk in the recently established endemic area of Northwestern Italy. **Zoonoses Public Health**. Berlin, v. 65, n. 6, p. 675-682, 2018.

FERRER, L. *et al.* Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet Rec.**, Oxford, v. 136, n. 20, p. 514-516, 1995.

FIGUEIREDO, M. J. F. M. E. *et al.* Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.15, n.1, p. 102-106, 2014.

FREITAS, J. C. C.; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **R.P.C.V.**, Lisboa, v. 105, n. 573/576, p. 11-20, 2010.

FRÉZARD, F. J. G. **Lipossomas como sistemas carreadores de fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral canina**. 2015. Disponível em:http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_visceral_canina.html. Acesso em: 16 set 2018.

GATTO, M. **Análise do perfil transcricional de células THP-1 infectadas com *Leishmania infantum/chagasi*: ênfase no inflamassoma e receptores NODs**. 2018. 103f. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita, Botucatu, 2018.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis, **Res Vet Sci.**, Oxford, v. 84, p. 269-277, 2008.

GOMEZ-OCHOA, P. *et al.* Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **Vet. J.**, London, v. 179, n. 2, p.259 -263, 2009.

GOMEZ-OCHOA, P. *et al.* Use of the nitroblue tetrazolium reduction test for evaluation of domperidone effects on the neutrophilic function of healthy dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 146, n. 1, p. 97- 99, 2012.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e Perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccine: still a long way to go. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.208, p. 94-100, 2015.

GRANO, F. G. *et al.* Toll-like receptors and cytokines in the brain and in spleen of dogs with visceral leishmaniosis. **Vet Parasitol.**, Amsterdam, v.253, p. 30-38, 2018.

GRIMALDI-JR, G. *et al.* Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLoS ONE**, San Francisco, p. 1-18, 2017

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. Chapter Five - Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 82, p. 155-184, 2013.

HASHEMI, S. A. *et al.* First case report of atypical disseminated cutaneous leishmaniasis in an opium abuser in Iran. **Rev. Inst. Med. Trop.**, Asuncion, v. 60, n.5, p. 1-5, 2018.

HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGU, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, Cambridge, v. 144, p. 95-115, 2017.

HOSEIN, S. *et al.* Transcription of Toll-Like Receptors 2, 3, 4 and 9, FoxP3 and Th17 Cytokines in a Susceptible Experimental Model of Canine *Leishmania infantum* Infection. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, p. 1-19, 2015.

JACINTHO, A.P. P *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitol Res.** Berlin, v. 117, n.6, p.1819-1827, 2018.

JIMÉNEZ-ANTÓN, M. D. *et al.* Pharmacokinetics and disposition of miltefosine in healthy mice and hamsters experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Eur J Pharm Sci.**, Amsterdam, v.5, n. 121, p. 281-286, 2018.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 22, n.9, p.439-445, 2006.

KIP, A.E. *et al.* Macrophage Activation Marker Neopterin: A Candidate Biomarker for Treatment Response and Relapse in Visceral Leishmaniasis. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, Lausanne, v. 8, article 181, 2018.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Vet Pathol.**, New York, v. 51, n. 2, p. 527-38, 2014.

KONODO K. R. J. *et al.* Análise histomorfométrica da matriz extracelular do linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 8, p. 610-616, 2009.

LARANJEIRA, D. F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor.** 2008. 78 f. Tese (Doutorado em Ciência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LÁZARO-SOUZA, M. *et al.* *Leishmania infantum* Lipophosphoglycan-Deficient Mutants: A Tool to Study Host Cell-Parasite Interplay. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 9, p. 1-10, 2018.

LEITE, B. M. M. The mass use of deltamethrin collars to control and prevent canine visceral leishmaniasis: A field effectiveness study in a highly endemic area. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 12, n. 5, e0006496, May, 2018.

LEMOS, E. M. *et al.* Avaliação do Teste Rápido Utilizando o Antígeno Recombinante k39 no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 36, p.36-28, 2003, Supl 2.

LIMA, M. L. **Estudo do mecanismo de ação de fármacos em Leishmania: uma abordagem metabólica não dirigida.** 2017.196 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

LOPES, A. H. *et al.* Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. **Open Parasitol. J.**, v. 4, p. 30-59, 2010. Disponível em: <https://openparasitologyjournal.com/VOLUME/4/PAGE/30/ABSTRACT/>. Acesso em: 26 ago 2021.

MANNA, L. *et al.* Interferon-gamma (INF-gamma), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. **Cytokine**, San Diego, v. 44, n.2, p.288-292, 2008.

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

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARTINS, N. S. *et al.* Alteração da matriz extracelular do esplênica em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Cienc. Anim. Bras.**, Goiás, v.16, n.1, p. 103-115, 2015.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária - Farmacologia e Técnicas.** 5 ed. Rio de Janeiro: Gen Grupo Editorial Nacional, 2008.

MELO, F. A. *et al.* Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 90, n. 5, p. 538–548, 2009.

MATEO, M. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. **Parasitol. Res.**, Berlin, v.105, n.1, p.155-162, 2009.

MONDELAERS, A. Miltefosine-resistant *Leishmania infantum* strains with an impaired MT/ROS3 transporter complex retain amphotericin B susceptibility. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.73, n.2, p. 392-394, 2018

MONTEIRO, E. M *et al.* Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 38, n.2, p.147-152, 2005.

MOREIRA, R. A. *et al.*, Miltefosine Increases Lipid and Protein Dynamics in *Leishmania amazonensis* Membranes at Concentrations Similar to Those Needed for Cytotoxicity Activity. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, Washington, v. 58, n. 6, p. 3021–3028, 2014.

MORENO, J. *et al.* Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish[®]) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 158, p. 199-207, 2014.

NOGUEIRA, C. T. *et al.* Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 113, n. 3, p. 197-201, 2018.

OLIVEIRA, G. A. *et al.* Evaluation of diagnostic methods applied to canine visceral leishmaniasis. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 6., 2017, Toledo. **Anais [...]**. San Francisco: PLoS Negl Trop Dis, 2017.

OLIVEIRA, G. A. *et al.* Nodulações esplênicas: leishmaniose visceral? **Acta Sci. Vet.**, Porto Alegre, 49, p.1112, 2021. Supl 1.

OLIVEIRA, H. S. **Avaliação hepática de cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral canina: aspectos ultrassonográficos modo B e Doppler**. 2015.47 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal), Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu. 2015.

OLIVEIRA, V. V. G.; ALVES, L. C.; SILVA- JUNIOR, V. A. Patologias genitais associadas à leishmaniose visceral canina. **Ciênc Rural**, Santa Maria, v.42, n.9, p. 1614-1620, 2012.

OLIVEIRA, H. S. **Avaliação renal e esplênica por meio da ultrassonografia modo - B e Doppler de cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral**. 2018.59 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal), Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu. 2018.

OLIVIER M.; GREGORY D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin Microbiol Rev.**, Washington, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.

PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* The development of a real-time PCR assay for the quantification of Leishmania infantum DNA in canine blood. **Vet. J.**, London, v. 189, p. 356-358, 2009.

PALTRINIERI, S. *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Chicago, v. 236, p.1184–1191, 2010.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 15, n. 63, p.94-102, 2015.

PEREIRA, A.V. **Atividade anti-leishmania e imunomodulatória in vitro da melitina natural na infecção experimental por Leishmania (L.) infantum chagasi**. 2013. 82 f. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais), Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita, Botucatu. 2013.

REIS, A. B. *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.

REIS, J. C. **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. 1. ed. Olinda: Copyright por José de Carvalho Reis, 2003. 651p.

REIS, T. A. R. *et al.* Ivermectin presents effective and selective antileishmanial activity in vitro and in vivo against *Leishmania infantum* and is therapeutic against visceral leishmaniasis. **Exp Parasitol.**, New York, v.221, e.108059, 2021.

REZENDE, M. B. *et al.* Detection of *Leishmania* spp. in Bats from an Area of Brazil Endemic for Visceral Leishmaniasis. **Transbound Emerg Dis.**, Berlin, v. 64, n.6, p.36-42, 2017.

RIBEIRO, K. R.C. **prospecção de novas drogas contra a leishmaniose cutânea: avaliação da atividade biológica da lectina de *Oreochromis niloticus***. 2016. 96f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) Instituto Aggeu Magalhães- Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RISTOW, L. E.; JÁCOME, D. O. **Métodos diagnósticos para pesquisa de hemoparasitas: revisão de literatura**. Disponível em: <http://www.tecsa.com.br/assets/pdfs/M%C3%89TODOS%20DIAGN%C3%93STICOS%20PARA%20PESQUISA%20DE%20HEMOPARASITAS.pdf>. Acesso em: 26 jun 2018.

ROCHA, M. A. N. *et al.* Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. **Braz. J. Biol.**, São Paulo, v. 78, n. 4, p. 609-614, 2018.

ROSÁRIO, C. J. R. M. *et al.* Quantificação da IL-10 e do INF- γ em cães com ou sem sinais clínicos de infecção com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 129-132, 2018.

RISUEÑO, J. *et al.* Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 256, p. 61-62, 2018.

SALES, D. P. *et al.* Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina e Humana no estado do Maranhão, Brasil (2009-2012)*. **Rev. bras. ciênc. vet.**, Niterói, v. 24, n. 3, p. 144-150, 2017.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado de Saúde de Santa Catarina. **Guia de orientação para a vigilância da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Disponível em: http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia_Basico_de_Orientacao_LVC_2018.pdf. Acesso em: 17 maio 2019.

SANTOS, I. F. C. **Ultrassonografia abdominal de cães e gatos hípidos, adultos e filhotes**. 2009. 189 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2009.

SANTOS, M. F. *et al.* Meglumine Antimoniate and Miltefosine Combined With Allopurinol Sustain Pro-inflammatory Immune Environments During Canine Leishmaniasis Treatment. **Front. Vet. Sci.**, Lausanne, v. 18, n. 6, p. 362, 2019

SANTOS, S. N *et al.* A miltefosina no tratamento de cães com leishmaniose e seus efeitos hematológicos e bioquímicos. **J Business Techn.**, Tocantins, v. 18, n. 4, p. 174-207, 2020.

SCHIMMING, B. C. *et al.* Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Rev. cient. eletrônica med. vet.**, v. 10, n. 19, p. 1-17, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/140317>, Acesso em: 6 jul 2021.

SECUNDINO, N. F. *et al.* The transmission of *Leishmania infantum* chagasi by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. **Parasit Vectors**, London, v. 19, n. 5, p. 20, 2012

SILVA, A.V. A. *et al.* Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of *Leishmania infantum* naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 12, n. 4, e0006445, 2018.

SILVA, C. M. H. S.; WINCK, C. A. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Rev. Univ. Vale Rio Verde**, v. 16, n. 1, 2018. Disponível em: http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/3383/pdf_793. Acesso em: 26 ago 2021

SILVA, D. T. *et al.* Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 179-186, 2014.

SILVA, D. T. *et al.* T lymphocytes and macrophages in the intestinal tissues of dogs infected with *Leishmania infantum*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 159-170, 2017.

SILVA, R. B. S. *et al.* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesqui. Vet. Bras**, Rio de Janeiro, n. 36, v. 7, p. 625-629, 2016.

SILVA, Y. J. **Caracterização morfológica das alterações dos linfonodos associadas às formas graves da leishmaniose visceral canina.** 2019.95 f. Dissertação (Mestrado em em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa), Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador. 2019

SILVEIRA, N. S. D. *et al.* Leishmaniose visceral em cães. **Acta Sci Vet**, Porto Alegre, v. 49, n. 610, 2021, Supl 1.

SCHONIAN, G.; MAURICIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? **Trends Parasitol**, Oxford, v.26, n.10, 2010.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **RBCF**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L., DI FILIPPO, L., ORDEIX, L. *et al.* Early reduction of *Leishmania infantum*-specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease. **Parasites Vectors**, London, v. 9, n. 1, p. 235-244, 2016.

SOUZA G.; LIMA, G.H.M.A. Eutanásia canina como medida profilática para o controle da leishmaniose humana: uma abordagem bioética. **Evidência**, v. 18, n. 1, p. 21-39, 2018. Disponível em: <https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/evidencia/article/view/16977>. Acesso em: 26 ago 2021.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 9, p. 1-4, 2013.

TIWARY, P. *et al.* Identification and Functional Validation of a Biomarker for the Diagnosis of Miltefosine Relapse during Visceral Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 98, n.2, p. 492-496, 2018.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015. 678 p.

TONIN, A. A. *et al.* Novel markers of inflammatory response and hepatic dysfunction in canine leishmaniasis. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, Oxford, v. 44, p. 61-4, 2016.

TORRENT, E. *et al.* Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **J. Small Anim. Pract.**, Oxford, v. 46, n.11, p. 549–552, 2005.

TRAVI, B.L. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n.1, e0006082, 2018.

VIDES, J. P. **Expressão gênica das interleucinas il-4, il-10, Il-12 e de interferon gama no baço de gatos infectados por *Leishmania infantum chagasi***. 2014. 81f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2014.

VIEIRA NETO, F. A. Avaliação de parâmetros bioquímicos em cães infectados por *Leishmania chagasi*. **Rev. Ciênc. Saúde**, v.13, n. 2, p. 131-140, 2011. Disponível em: <http://www.periodicoeletronicos.ufma.br/index.php/rcisaude/article/view/1294/2812>. Acesso em: 26 ago 2021.

VIRBAC. **Milteforan**. Disponível em: https://br.virbac.com/files/live/sites/br-public/files/contributed/PDFs/AF_FAQ_DIGITAL.pdf. Acesso em: 30 agosto 2018.

VOTÝPKA, J. *et al.* New approaches to systematicsof trypanosomatidae: criteria fot taxonomic (Re) description. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 31, n. 10, p. 460-469, 2015.

NEDEL, W. L.; SILVEIRA, F. Os diferentes delineamentos de pesquisa e suas particularidades na terapia intensiva. **Rev Bras Ter Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 256-260, 2016.

WAITUMBI, J.; WARBURG, A. Phlebotomus papatasi Saliva Inhibits Protein Phosphatase Activity and Nitric Oxide Production by Murine Macrophages. **Infect. Immun.**, Washington, v. 66, n. 4, 1534–1537, 1998.

WHEAT, W. H. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7 and cytokine secretion and reprograms dendritic

cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. **J Immunol.**, Baltimore, v. 180, n.12, p. 8286–8298, 2008

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. **WHO technical report series**, n. 949, p. 22-26, 2010. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>. Acesso em 10 jan. 2019

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Weekly epidemiological record. Geneva: WHO, 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258973/1/WER9238.pdf?ua=1>. Acesso em: 10 mar. 2018

APENDICE A-ARTIGO RELACIONADO PUBLICADO EM REVISTA

Revista Brasileira de Parasitologia/Veterinária
**Brazilian Journal of
 Veterinary Parasitology**
 ISSN 1984-2961 (Electronic)
www.cbpv.org.br/jbvpv

Short Communication

Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in neutrophil from peripheral blood in a naturally infected dog

Detecção de formas amastigotas de *Leishmania infantum* em neutrófilos do sangue periférico de cão naturalmente infectado

Gilsan Aparecida de Oliveira^{1*}; Vitória Alina Santos Sarmiento²; Ericka Wanessa da Silva Costa²; Rômulo Pessoa-e-Silva³; Rayana Carla Silva de Moraes¹; Roberto Rômulo Ferreira²; Ana Paula Sampaio Faltosa²; Fábio André Brayner^{1,3}; Luiz Carlos Alves^{1,3}

¹Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Cavalcoti Cruz - FIOCRUZ-PE, Pernambuco, PE, Brazil

²Laboratório de Doenças Parasitárias, Centro Universitário CESMAC, Fundação Jayme de Alencar, Macaó, AL, Brazil

³Laboratório de Imunopatologia Koza Aami - LKA, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil

How to cite: de Oliveira GA, Sarmiento VAS, Costa EWS, Pessoa-e-Silva R, Moraes RCS, Ferreira RR, et al. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in neutrophil from peripheral blood in a naturally infected dog. *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(3): e004821. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021000>

Abstract

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a zoonotic disease of high lethality caused by *Leishmania infantum* in the Americas. In the infected dog, the amastigotes are scarce in blood, especially in the late phase of the disease. This study aimed to report a rare case of *L. infantum* amastigotes found in neutrophils from peripheral blood of a naturally infected dog in terminal phase of CVL, also describing its clinical status before and after treatment with miltefosina 2%. The dog, which presented as polysymptomatic and with classical signs and symptoms of CVL was submitted to the following tests: Dual Path Platform (DPP) rapid test, ELISA and parasitological examination of peripheral blood. Hematological and biochemical parameters were obtained before and after treatment. All diagnostic tests were positive for CVL. The identification of *L. infantum* amastigotes inside neutrophils from peripheral blood was confirmed through microscopy, and the species was confirmed by molecular analysis. At the end of the treatment, peripheral parasitemia was not detected, and improvements were observed in clinical and laboratorial parameters. Finally, this atypical finding can be used as example to raise discussions about the real immunological role of neutrophils in late phases of CVL and its clinical/therapeutic implications.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, blood smear, peripheral blood, neutrophil, amastigote.

Resumo

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença zoonótica de alta letalidade causada por *Leishmania infantum* nas Américas. No cão infectado, as formas amastigotas são escassas no sangue, principalmente na fase tardia da doença. Este estudo teve como objetivo relatar um caso raro de amastigotas de *L. infantum* encontradas em neutrófilos do sangue periférico de um cão naturalmente infectado e terminal da LVC descrevendo também seu estado clínico antes e após o tratamento com miltefosina a 2%. O cão, que se apresentou como polissintomático e com sinais e sintomas clássicos da LVC, foi submetido aos seguintes testes: teste rápido Dual Path Platform (DPP), ELISA e exame parasitológico de sangue periférico. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram obtidos antes e após o tratamento. Todos os testes diagnósticos foram positivos para LVC. A identificação de formas amastigotas de *L. infantum*, dentro de neutrófilos do sangue periférico foi confirmada por microscopia, e a espécie foi confirmada por análise molecular. Ao final do tratamento, não foi detectada parasitemia periférica, observando-se melhora dos parâmetros clínicos e laboratoriais. Por fim, esse achado atípico pode ser usado como exemplo para levantar discussões sobre o real papel imunológico dos neutrófilos nas fases tardias da LVC e suas implicações clínicas/terapêuticas.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, sangue periférico, esfregaço de sangue, neutrófilo, amastigota.

Received March 19, 2021. Accepted June 2, 2021.

*Corresponding author: Gilsan Aparecida de Oliveira. E-mail: deoliveira_gilsan@gmail.com



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

APENDICE B –ARTIGO RELACIONADO PUBLICADO EM REVISTA



Acta Scientiarum Veterinariae, 2021, 49(Suppl 1):.

CASE REPORT
Pub.

ISSN 1679-9216

Nodulações esplênicas: leishmaniose visceral canina?

Splenic Nodules: Canine Visceral leishmaniasis?

Gilsan Aparecida de Oliveira^{1,2}, Vitória Alina Santos Sarmiento², Isabelle Vanderlei Martins Bastos²,
Alberon Ribeiro de Araújo³, Ligia Buzzá Roo de Mendonça², Ana Paula Sampalo Feltosa⁴,
Fábio André Brayner^{1,4} & Lutz Carlos Alves^{1,4}

ABSTRACT

Background: Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a parasitic disease of high lethality caused by the protozoan *Leishmania infantum* in Brazil and is often related to splenomegaly. However, splenic nodules in dogs, although frequent, have not previously been reported as associated with CVL, but with neoplastic diseases. Considering that most dogs infected are oligosymptomatic or asymptomatic and that splenic nodules are common to other diseases, it is prudent to differentially diagnose CVL, in view of its high zoonotic potential and lethality. The objective of the study was to describe a case of splenomegaly with splenic nodules associated with CVL in an asymptomatic dog treated with 2% miltefosina.

Case: A 5-year-old male Rottweiler with 41 kg, with a history of inappetence, apathy and weight loss was referred to the Veterinary Medicine School Clinic of the Cesmac University Center, Maceió, AL, Brazil. However, during palpation a slight increase in the spleen was noted. Hematological, hemoparasite, biochemical and abdominal ultrasonographic examinations were requested to clarify the clinical suspicion of hemoparasitosis. The hematological and biochemical results respectively showed the following: normocytic normochromic anemia, hyperproteinemia and thrombocytopenia, in addition to hypoalbuminemia, with elevated total protein levels. The test for hemoparasites was negative. Ultrasonography showed mixed echogenicity suggestive of nodules. The rapid test for *Ehrlichia*, *Anaplasma* and *L. infantum* was performed. It was positive only for *L. infantum*. ELISA, IFAT and qPCR tests were performed to confirm the result. The test showed a cut-off result of 0.371 for ELISA, positive for RIFI at a cut-off of 1:40 and qPCR with less than 1 fg and with amplification above 36 cycles. In view of these results, treatment with 2% miltefosina at a dose of 1 ml / 10 kg was started once a day, after feeding, for 28 days. The animal was monitored throughout treatment and re-evaluated every 10 days for 30 days, showing signs of clinical development, presenting satisfactory results.

Discussion: Canine splenomegaly can be associated with a variety of disease possibilities. In asymptomatic canine visceral leishmaniasis (CanL), the slight increase in spleen and the presence of splenic nodules may lead to a false diagnosis. Splenic nodules may be associated with dogs of advanced age and may be due to lymphoid nodular hyperplasia, which causes nodules with echogenicity, hyperechoic regions with well demarcated irregularity, with centralized hypoechoic areas and an absence of hematological and biochemical alterations. The cause of splenomegaly associated with nodules may be difficult to diagnose and require much time and effort. Therefore, diseases such as visceral leishmaniasis of high lethality must be the priority in differential diagnosis in endemic areas in order to minimize the risk of transmission. In addition to allowing an early intervention aiming at good animal health results and preventive measures, such as the use of repellent collars that reduce the risk of phlebotomo infection. The differential diagnosis of CVL is necessary in endemic areas, even in asymptomatic dogs that may present splenic alterations suggestive of other diseases. Treatment with 2% miltefosina was shown to be, in this case, effective at reducing the splenic nodules and a good alternative for the quality of life of the animal.

Keywords: *Leishmaniasis*, splenomegaly, nodules, diagnosis, miltefosina.

Descritores: *Leishmaniasis*, splenomegalia, nódulos, diagnóstico, miltefosina.

DOI: 10.20154/1679-9216.S08188

Recv./rev: 2020

Accepted: 2020

Published: 2021

¹Instituto Aggeu Magalhães (IAM) - FIOCRUZ, PE, Recife, PE, Brazil. ²Centro Universitário Cesmac (CESMAC), Maceió, AL, Brazil. ³Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife. ⁴Laboratório de Imunoparasitologia Katozi Atami (I.JKA) - UFPE. CORRESPONDENCE: G.A Oliveira [dorliveira.ginas@gmail.com] & L.C. Alves [albe.lealves390@gmail.com]. Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, CEP 50670-420 Recife, PE, Brazil.

APENDICE C –

ARTIGO RELACIONADO SUBMETIDO A REVISTA

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



Basophils as a predictive hematological biomarker of canine visceral leishmaniasis in the treatment with miltefosine

Journal:	Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Articles
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	de Oliveira, Gilson; Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Parasitology; Centro Universitário CESMAC, Medicine Veterinary Alves de Oliveira, Claudia ; Centro Universitário CESMAC, Medicine Veterinary Matias, Márcio Calixto; Federal University of Alagoas Tibúrcio de Araújo, Natália; Centro Universitário CESMAC, veterinary medicine do Nascimento Bugarin Caldas, Rachel; Centro Universitário CESMAC, veterinary medicine Feltosa, Ana Paula; Universidade Federal de Pernambuco, Tropical Medicine Santos, Fábio André; Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Parasitology Alves, Luiz Carlos ; Aggeu Magalhães Research Centre, Parasitology
Keyword:	Leishmania infantum, Therapeutics, Dogs, Miltefosine, Leucocytes Basophils
Theme:	Biomarker, Leishmaniasis

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO A- FICHA CLÍNICA
FICHA CLÍNICA

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome do animal:	ID:
Local de origem:	Destino: () Adoção () Eutanásia () Domiciliado
Responsável:	
Endereço:	Tel. ()
Material colhido: () Punção de medula ___µl () Sangue ___ml () Aspirado de lesão___ µl () <i>Imprint</i> de lesão () raspado de lesão	Data da coleta:_____/_____/_____ Data do processamento: _____/_____/_____

- Indicação de inclusão no experimento:

2 DADOS DO ANIMAL

RAÇA:_____ IDADE:_____ SEXO: M () F ()

PORTE: () PEQUENO () MÉDIO () GRANDE

COR: () CLARA () ESCURA

PELAGEM: () CURTA () LONGA

3 EXAME FÍSICO GERAL

a) Inspeção

Lesão de pele: () sim () não (MARCAR NA RESENHA)

Onicogrifose: () sim () não

Escore corporal do cão: () Caquético () Magro () Normal () Gordo () Obeso.

Abdômen: () Normal () Dilatado () Abaulado () Retraído () normal

Desidratação: () 5% () 10% () 15% () 20% () normal

Edema: () ocular () membros () subcutâneo () normal

Secreção: () ocular () vaginal/prepucial

Presença de ectoparasitas: () sim () não

Dermatite: () sim () não / () localizada () generalizada/ () COM prurido
() SEM prurido

Alopecia: () sim () não

OUTRAS

OBSERVAÇÕES: _____

b) Parâmetros vitais

Frequência cardíaca: () aumentada () normal(60/160bpm) () baixa

Valor: _____

Frequência respiratória: () aumentada () normal(18/36mrpm) () baixa

Valor: _____

Tempo de perfusão capilar: () aumentada () normal(1-2 segundos) () baixa

Valor: _____

Temperatura retal: () aumentada () normal(37,5 -39,2°C) () baixa

Alterações cardiorrespiratórias: () presente () ausente

Descrição da alteração:

c) Exame de mucosa:

Cor de mucosa ocular: () pálida (esbranquiçada) () congesta ou hiperemica (vermelha) () Cianótica (azul) () ictérica (amarelada) () normal

Cor de mucosa oral: () pálida () congesta ou hiperemica () Cianótica (azul) () ictérica () normal

d) Palpação de linfonodo

Hipertrofia de linfonodos: () sim () não (MARCAR NA RESENHA)

Mandibular ou Maxilar: () Hipertrofiado () normal

Pré-escapulares ou cervicais superficiais: () Hipertrofiado () normal

Poplíteo: () Hipertrofiado () normal

Inguinais: () Infartado () normal

e) Palpação de abdominal

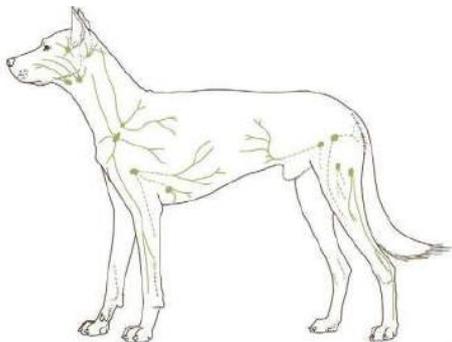
Fígado: () aumentado () normal

Baço: () aumentado () normal

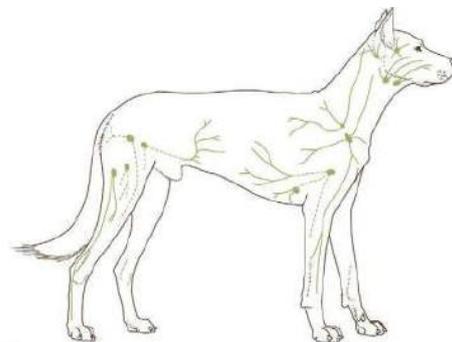
intestino: () aumentado () normal

Presença de fezes: () sim () não

Gestante: () sim () não



Lado esquerdo



Lado direito

ANEXO B –PARECER CONSUBSTÂNCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO CENTRO UNIVERSITÁRIO CESMAC



Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Cesmac (CEUA/CESMAC)

Registro nº 01200702819/2016-97 – CIAEP/CONCEA – 10/10/2016.

Maceió, 26 de Julho de 2018.

PARECER CONSUBSTÂNCIADO

I) IDENTIFICAÇÃO:

Protocolo Nº: 13A/2018 **Título:** O uso do teste imunocromatográfico na detecção de imunoglobulinas G anti-*Leishmania infatum* em cães com leishmaniose visceral, submetidos ao tratamento com miltefosina.

Pesquisador Responsável: Profa Gilsan Aparecida de Oliveira

Instituição Responsável: Centro Universitário Cesmac

Data Entrada: 07/07/2018

II) SUMÁRIO DO PROJETO:

RESUMO DO PROJETO

Os cães possuem um papel importante por serem considerados importantes reservatórios urbanos de *L. infatum*. Desta forma, considerando a importância do cão no ciclo da LV é que as medidas de prevenção e controle são direcionadas principalmente a esta espécie. O uso legalizado da miltefosina para o tratamento de cães com LV, no Brasil, é recente, sendo portanto, necessários estudos que comprovem sua eficácia de modo que obtenha-se a cura desses animais diagnosticados nos testes de triagem. O objetivo do estudo é aplicar o teste imunocromatográfico na detecção de imunoglobulinas G anti- *Leishmania infatum* em cães com leishmaniose visceral, submetidos ao tratamento com miltefosina. Serão formados 4 grupos de 8 animais de acordo com a classificação do Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG) conforme sinais clínicos e exames sorológicos e parasitológico para *L. infantum*, hematológicos e bioquímicos. Será aplicado o protocolo terapêutico, cuja base farmacológica principal é a miltefosina. Durante o tratamento de 28 dias os animais serão avaliados, através dos exames citados acima, a cada 10 dias a fim de verificar a ocorrência de cura ou melhora clínica dos animais. Assim, acredita-se que o estudo irá contribuir fornecendo dados pioneiros sobre o tratamento com miltefosina nas diferentes fases clínicas da doença, bem como observação do momento da soroconversão. Desta forma, será oferecida uma melhor qualidade de vida ao animal em tratamento, bem como diminuição do risco de infecção humana e canina, devido a provável cura do animal.

III) COMENTÁRIOS ÉTICOS:

- 1) Nº de animais: 32
- 2) Há justificativa para utilizar o número de animais: sim
- 3) Haverá sacrifícios de animais: Não
- 4) O veterinário responsável pelo estudo é o pesquisador principal: sim

Protocolo Nº: 13A/2018 **Título:** O uso do teste imunocromatográfico na detecção de imunoglobulinas G anti- *Leishmania infatum* em cães com leishmaniose visceral, submetidos ao tratamento com miltefosina



- 5) Os animais necessitarão permanecer em condições especiais (temperatura, alimentação ou jejum...) **Não**
- 7) Haverá procedimentos invasivos no animal justificáveis pela metodologia: sim
- 8) A relação risco benefício é compatível
- 9) Os benefícios serão alcançados: sim

IV) CONCLUSÃO DO

PARECER APROVADO

Ilmo. Profa. Ma. Gilsan Aparecida de Oliveira, de acordo com as diretrizes para pesquisas com animais definidas pela Lei 11.794/2008 e decreto 6.899/2009, seu protocolo está **APROVADO**, lembre-se que:

- V.Sª. deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade por este CEUA, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao animal participante;
- O CEUA deve ser imediatamente informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É responsabilidade do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas a evento adverso ocorrido e enviar notificação a este CEUA e, em casos pertinentes, à CONCEA;
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas;
- Seus relatórios parciais e final devem ser apresentados a este CEUA, inicialmente em 30/03/11 e ao término do estudo. A falta de envio de, pelo menos, o relatório final da pesquisa implicará em não recebimento de um próximo protocolo de pesquisa de vossa autoria.

Atenciosamente,


Prof. Muriel Magda Lustosa Pimentel
Coordenadora do CEUA/CESMAC

ANEXO C-DECLARAÇÃO DE INFRAESTRUTURA E INSTALAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA



DECLARAÇÃO DE INFRAESTRUTURA E INSTALAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA E SUAS CONSEQUÊNCIAS

Protocolo de pesquisa: **Avaliação da resposta imune, acompanhamento da carga parasitária e evolução clínica de cães infectados com *Leishmania* spp. submetidos ao tratamento com Milteforan**

Pesquisador responsável: *Gilsan Aparecida de Oliveira*

Para a realização da pesquisa serão necessárias as instalações e equipamentos e insumos dos setores listados abaixo, que podem ser encontrados na *Clínica Escola de Medicina Veterinária do Cesmac*, e foram previamente liberados, conforme assinaturas abaixo:

Setor	Assinatura do responsável técnico pelo setor
Consultório	<i>[Assinatura]</i>
Laboratório de Imagens	<i>Luiza Ruzza Foz de Mendonça Lameira</i>
Laboratório de Análises Clínicas	<i>Isabelle Vandereii Martins Bastos</i>
Laboratório de Doenças Parasitárias	<i>[Assinatura]</i>

[Assinatura]
Atenciosamente,