



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS**

**AVALIAÇÃO DE UM PROTOCOLO IMUNOTERAPÊUTICO CONTRA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA UTILIZANDO LASAP ASSOCIADA AO
ALOPURINOL**

RICARDO BIROLINI CLASTA

Foz do Iguaçu
2021



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS**

**AVALIAÇÃO DE UM PROTOCOLO IMUNOTERAPÊUTICO CONTRA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA UTILIZANDO LASAP ASSOCIADA AO
ALOPURINOL**

RICARDO BIROLINI CLASTA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana

Foz do Iguaçu
2021

RICARDO BIROLINI CLASTA

**AVALIAÇÃO DE UM PROTOCOLO IMUNOTERAPÊUTICO CONTRA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA UTILIZANDO LASAP ASSOCIADA AO
ALOPURINOL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Kelvinson Fernandes Viana
(UNILA)
Orientador



Dr. Flávio Luiz Tavares (UNILA)



Dra. Renata Prestes Antonangelo
(UDC)

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 22 de dezembro de 2021.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

C614a

Clasta, Ricardo Birolini.

Avaliação de um protocolo imunoterapêutico contra a leishmaniose visceral canina utilizando Lasap associada ao Alopurinol / Ricardo Birolini Clasta. - Foz do Iguaçu, 2022.

59 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

Orientador: Kelvinson Fernandes Viana.

1. Leishmaniose Visceral Canina. 2. Leishmania infantum. 3. Imunoterapia. I. Viana, Kelvinson Fernandes, Orient. II. Título.

CDU: 636.7:616.99

Para Livia e Stella.

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus pela força que Ele me passou através de minhas orações no decorrer do mestrado.

Ao meu orientador, amigo e professor, Dr. Kelvinson Viana, pelos ensinamentos, suporte, apoio e confiança demonstrada por todo o curso, bem como aos seus colegas da UFMG pelos exames de PCR efetuados em nossos animais.

Não tenho palavras para agradecer a minha esposa Patrícia, por toda a paciência que teve comigo durante os momentos de estudo, aulas, ensaios durante a noite para apresentar palestras em inglês (valeram algumas risadas). Em todos os momentos que desanimei, ela soube dosar o momento certo para aguardar passar ou me chacoalhar para que eu voltasse ao foco, à Patrícia, sem sombra de dúvidas, tornou todo esse processo do mestrado mais fácil.

Agradecer a minha mãe Laura e meu irmão Roberto pelo apoio e incentivo que sempre me passaram, mesmo longe fisicamente, sei que pensavam e que ainda pensam em mim todos os dias, o que me dá mais ânimo e disposição para crescer e evoluir cada vez mais. Ao meu sobrinho Caio que, com suas videochamadas, me faz matar um pouco das saudades que sinto deles e da minha sobrinha Carolina, que é minha primeira afilhada e tem um sorriso capaz de transformar qualquer momento triste em um sorriso.

Gostaria de agradecer todo o apoio que tive das Médicas Veterinárias da Clínica Happy Pet, Isabela Ranucci Lemos e Marina Vendramin e da Clínica Baby Cão, Ayrton Salvatti, Andrei Salvatti e Thiago Salvatti, Alison Veiga, Guilherme e Maycon Calicho, por abrirem um espaço em suas clínicas e um enorme tempo de suas rotinas para que eu pudesse realizar esse trabalho, me ajudando em todos os sentidos com as coletas, anestésias e recuperação dos animais.

Aos amigos do mestrado, como a Roberta Ruiz, que nunca permitiu que ninguém do grupo desanimasse e que dá um abraço forte, capaz de tirar qualquer mágoa ou tristeza. A Juliana Esteves e Luciana Chiyo, com as quais trocava artigos como eu fazia com figurinhas na minha infância e a Beatriz Meirelles, que nos fazia não nos sentir tão perdidos, pois ninguém a superava.

Por último a todos os tutores que acreditaram em nosso trabalho e permitiram que tratássemos de seus animais pois, sem vocês que acreditaram em nossa pesquisa, ela não seria possível. Muito obrigado.

***No meio da dificuldade, encontra-se a
oportunidade.***

(Albert Einstein)

CLASTA, Ricardo Birolini. **Avaliação de um protocolo imunoterapêutico contra Leishmaniose Visceral Canina utilizando Lasap associada ao Alopurinol.** 2021. 57p. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu.

RESUMO

Atualmente a Leishmaniose Visceral (LV) é considerada a mais negligenciada de todas as doenças negligenciadas e sua prevalência excede 12 milhões de casos em todo o mundo. Além de endêmica, a LV encontra-se em franca expansão em várias regiões do Brasil e do mundo. Destaca-se o aparecimento da doença em países do Mercosul, considerados anteriormente como indenes para LV. Em relação à Leishmaniose Visceral Canina (LVC), recentemente o Ministério da Saúde, junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou uma nota técnica liberando o tratamento da enfermidade canina com a miltefosina (MAPA/MS, 2016). Entretanto, o tratamento com esta droga ainda não é capaz de resolver o problema no cão, permanecendo o mesmo parasitado e necessitando repetir o mesmo protocolo terapêutico após alguns meses. Nesse contexto, a utilização da imunoterapia tem ganhado grande atenção na busca por protocolos terapêuticos mais efetivos, principalmente nas formas mais graves da LV e LVC. No presente estudo, foi realizada uma pesquisa com 9 animais naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, grupo tratado com imunoterápico LaSap (Antígenos totais de *L. amazonensis* mais saponina), seguido da administração do Alopurinol (n= 4), obedecendo o protocolo do fabricante e grupo tratado unicamente com o imunoterápico LaSap (n= 5). Todos os animais melhoraram os sinais clínicos atribuídos a LVC, não demonstraram alteração em exames hematológicos e o qPCR de medula e pele indicaram redução da carga parasitária na medula no grupo vacina em T0 (antes do início do tratamento) e T2 (após o tratamento) $P=0,038$ ($36,6 \pm 10,0$) e ente os grupos vacina + alopurinol em T2, $P=0,01$, ($47,0 \pm 33,7$). Na pele, não houve diferenças estatísticas ente os dois grupos em T2, somente no grupo vacina em T0 e T2 $P=0,01$ ($14,8 \pm 12,7$) e grupo vacina + alopurinol em T0 e T2, $P=0,05$ ($19,8 \pm 19,1$). Neste sentido, verificamos que ambas as estratégias de tratamento foram capazes de melhorar as condições clínicas, bem como reduzir a carga parasitária na pele e medula.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral Canina. *Leishmania infantum*. Imunoterapia.

CLASTA, Ricardo Birolini. **Evaluación de un protocolo inmunoterapéutico contra la Leishmaniasis Visceral Canina utilizando Lasap asociado a Alopurinol.** 2021. 57p. Disertación de Maestría del Programa de Posgrado en Biociencias - Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu.

RESUMEN

Actualmente, la Leishmaniasis Visceral (LV) se considera la más desatendida de todas las enfermedades desatendidas y su prevalencia supera los 12 millones de casos en todo el mundo. Además de ser endémica, la LV se está expandiendo rápidamente en varias regiones de Brasil y del mundo. Destaca la aparición de la enfermedad en países del Mercosur, antes considerados libres de LV. En relación a la Leishmaniasis Visceral Canina (LVV), recientemente el Ministerio de Salud, en conjunto con el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA), publicaron una nota técnica divulgando el tratamiento de la enfermedad canina con miltefosina (MAPA/MS, 2016). Sin embargo, el tratamiento con este fármaco aún no es capaz de solucionar el problema en el perro, quedando igual parasitado y necesitando repetir el mismo protocolo terapéutico al cabo de unos meses. En este contexto, el uso de la inmunoterapia ha ganado gran atención en la búsqueda de protocolos terapéuticos más efectivos, especialmente en las formas más severas de LV y LVC. En el presente estudio se realizó una encuesta con 9 animales naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, grupo tratado con inmunoterapia LaSap (Antígenos totales de *L. amazonensis* más saponina), seguida de la administración de Alopurinol (n= 4), siguiendo el protocolo del fabricante y grupo tratado solo con la inmunoterapia LaSap (n= 5). Todos los animales mejoraron los signos clínicos atribuidos a LVC, no mostraron cambios en los exámenes hematológicos y la qPCR de médula y piel indicó una reducción en la carga parasitaria en la médula en el grupo vacunado en T0 (antes del inicio del tratamiento) y T2 (después de tratamiento) $P=0,038$ (36,6+10,0) y entre los grupos vacuna + alopurinol en T2, $P=0,01$, (47,0+33,7). En la piel no hubo diferencias estadísticas entre los dos grupos en T2, solo el grupo vacuna en T0 y T2 $P=0,01$ (14,8+12,7) y el grupo vacuna + alopurinol en T0 y T2, $P=0,05$ (19,8 +19.1). En este sentido, encontramos que ambas estrategias de tratamiento lograron mejorar las condiciones clínicas, así como reducir la carga parasitaria en la piel y la médula espinal.

Palabras clave: Leishmaniasis visceral canina. *Leishmania infantum*. Inmunoterapia.

CLASTA, Ricardo Birolini. **Evaluation of an immunotherapeutic protocol against Canine Visceral Leishmaniasis using Lasap associated with Allopurinol.** 2021. 57p. Master's dissertation of the Postgraduate Program in Biosciences - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu.

ABSTRACT

Currently, Visceral Leishmaniasis (VL) is considered the most neglected of all neglected diseases and its prevalence exceeds 12 million cases worldwide. In addition to being endemic, VL is rapidly expanding in several regions of Brazil and the world. The emergence of the disease in Mercosur countries, previously considered as free from VL, stands out. In relation to Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), recently the Ministry of Health, together with the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), published a technical note releasing the treatment of canine disease with miltefosine (MAPA/MS, 2016). However, the treatment with this drug is still not able to solve the problem in the dog, remaining the same parasitized and needing to repeat the same therapeutic protocol after a few months. In this context, the use of immunotherapy has gained great attention in the search for more effective therapeutic protocols, especially in the most severe forms of VL and CVL. In the present study, a survey was carried out with 9 animals naturally infected by *Leishmania infantum*, a group treated with immunotherapy LaSap (Total antigens of *L. amazonensis* plus saponin), followed by the administration of Allopurinol (n= 4), following the manufacturer's protocol and group treated only with the immunotherapy LaSap (n= 5). All animals improved the clinical signs attributed to CVL, showed no change in hematological examinations and the qPCR of marrow and skin indicated a reduction in the parasite load in the marrow in the vaccine group at T0 (before the start of treatment) and T2 (after treatment) $P=0.038$ (36.6+10.0) and between the vaccine + allopurinol groups in T2, $P=0.01$, (47.0+33.7). In the skin, there were no statistical differences between the two groups at T2, only in the vaccine group at T0 and T2 $P=0.01$ (14.8+12.7) and the vaccine group + allopurinol at T0 and T2, $P=0, 05$ (19.8+19.1). In this sense, we found that both treatment strategies were able to improve clinical conditions, as well as reduce the parasite load on the skin and spinal cord.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis. *Leishmania infantum*. Immunotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição de casos da LV por UF no Brasil	21
Figura 2 – Fluxograma do ciclo evolutivo	24
Figura 3 – Análises leucocitárias de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos aos dois protocolos de tratamento (LaSap em branco e LaSap + Alopurinol em preto) nos três tempos T0 (antes do início do tratamento), T1(após as aplicações semanais) e T2 (final do tratamento). As linhas tracejadas em vermelho indicam os limites mínimos dos valores de referência. As linhas conectoras indicam diferença estatística $P \leq 0,05$	39
Figura 4 – Análises bioquímicas de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos aos dois protocolos de tratamento (LaSap em branco e LaSap + Alopurinol em preto) nos três tempos T0 (antes do início do tratamento), T1(após as aplicações semanais) e T2 (final do tratamento). As linhas tracejadas em vermelho indicam os limites mínimos e máximos dos valores de referência.	40
Figura 5 – As análises de carga parasitária através de qPCR de cada animal estudado de medula e biópsia de pele e medula entre o grupo vacina em T0 e T2 e ente os grupos vacina + alopurinol em T0 e T2	41
Figura 6 – Análises em grupo da carga parasitária de medula e pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos aos dois protocolos de tratamento (LaSap ou LaSap + Alopurinol) nos tempos T0 (antes do tratamento) e T2 (30 dias após tratamento)	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Órgão e Lesões envolvidos	28
Quadro 2 – Técnicas diagnósticas LVC	29
Quadro 3 – Evolução dos sinais clínicos atribuídos a LVC nos animais do grupo vacina de acordo com os tempos T0 (antes do início do tratamento), T1 (após as aplicações semanais) e T2 (no final do tratamento)	37
Quadro 4 – Evolução dos sinais clínicos atribuídos a LVC nos animais do grupo vacina + alopurinol de acordo com os tempos T0 (antes do início do tratamento), T1 (após as aplicações semanais) e T2 (no final do tratamento)	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IFAT	<i>Immunofluorescence Antibody Test</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Muco-cutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LTPK	Leishmaniose Tegumentar Pós-Kalazar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MVCLV	Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONGs	Organizações Não Governamentais
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	18
2.2 ETIOLOGIA DA DOENÇA	18
2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....	20
2.4 O CICLO DE VIDA E TRANSMISSÃO DA LVC	23
2.4.1 A importância do cão como reservatório do parasito	25
2.5 SINAIS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO DA LVC	26
2.6 PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA LVC.....	30
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS.....	32
4.1 OBJETIVO GERAL	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5 MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	33
5.2 CULTIVO DOS PARASITOS PARA GERAÇÃO DE ANTÍGENOS TERAPÊUTICOS	33
5.3 PROTOCOLO TERAPÊUTICO	34
5.4 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA	34
5.5 SOROLOGIA ANTI-LEISHMANIA	35
5.6 ANÁLISES DA CARGA PARASITÁRIA DA PELE POR PCR EM TEMPO REAL	36
5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
6 RESULTADOS	37
6.1 RESULTADOS CLÍNICOS.....	37
6.2 VALORES HEMATOLÓGICOS	38
6.3 VALORES BIOQUÍMICOS	39
6.4 CARGA PARASITÁRIA	40
7 DISCUSSÃO	42

8 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

Consideradas problemas de saúde pública, as doenças transmitidas por vetores e causadas por protozoários acometem seres humanos e outros mamíferos, tendo grande potencial de letalidade e manifestações graves da doença. A Leishmaniose Visceral (LV), segunda principal doença causada por protozoários, apresenta-se com altos índices de incidência, o que se deve, especialmente, a alterações ambientais, problemas de saneamento básico e ampliação dos processos de expansão geográfica (CORTEGIANO; CHUCRI, 2020).

Presentes em mais de 98 países em todo o mundo, as Leishmanioses são responsáveis por cerca de 2 milhões de novos casos/ano e pela exposição de aproximadamente 350 milhões de pessoas, especialmente aquelas que residem em países em desenvolvimento. Nesse complexo de enfermidades zoonóticas, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) apresenta a forma mais grave da doença, dada a sua incidência e letalidade, acometendo seres humanos e tendo como reservatório principal o cão. Assim, o Ministério da Saúde preconiza o controle da LVC a partir de quatro pilares: (a) diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos; (b) combate ao vetor; (c) detecção de cães infectados por meio de uma combinação de testes sorológicos e eutanásia; (d) educação em saúde e conscientização da população (TEIXEIRA, 2019).

Em relação a LVC, recentemente o Ministério da Saúde junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou uma nota técnica liberando o tratamento da enfermidade canina com a miltefosina (MAPA/MS, 2016). Entretanto, o tratamento com esta droga ainda não é capaz de resolver o problema no cão, permanecendo o mesmo parasitado e necessitando repetir o mesmo protocolo terapêutico após alguns meses. Neste contexto, a utilização da imunoterapia tem ganhado grande atenção na busca por protocolos terapêuticos mais efetivos, principalmente nas formas mais graves da LV e LVC.

Dentre as alternativas terapêuticas promissoras para o tratamento da LV e LVC destaca-se a imunoterapia, utilizando-se vacinas terapêuticas ou imunomoduladores. Desta forma, a avaliação de propostas biotecnológicas inovadoras em terapêutica imunofarmacológica que possam ser empregadas no tratamento da LVC torna-se fundamental. Diante da relevância da temática, haja vista se tratar de um problema de saúde pública, e considerando que as estratégias de diagnóstico e tratamento se

encontram limitadas, o presente trabalho propõe-se a avaliar a imunoterapia utilizando uma vacina terapêutica composta por antígenos totais de *L. amazonensis* no tratamento de cães naturalmente parasitados por *L. infantum*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

As Leishmanioses são doenças causadas pelo protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, sendo transmitida por insetos hematófagos da subfamília flebotominae. As manifestações clínicas da Leishmaniose incluem Leishmaniose Cutânea (LC), muco-cutânea (LMC), Leishmaniose Tegumentar Pós-Kalazar (LTPK) e Leishmaniose Visceral. Esta última forma clínica é a única capaz de levar o paciente a morte, estando fortemente relacionada com regiões de baixo poder econômico (BOELAERT *et al.*, 2009).

Acerca da patologia, Santos e Alessi (2010) afirmam que seu desenvolvimento de ciclo biológico ocorre em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Desta forma, o hospedeiro vertebrado varia bastante em relação à espécie de *Leishmania* envolvida, entretanto, o invertebrado que transmite o microrganismo é sempre um vetor psicodídeo (mosquito-palha) da subfamília Phlebotominae.

Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam para uma incidência entre 50.000 a 90.000 novos casos diagnosticados em seres humanos por ano, tendo a forma canina de LV importantes características clínicas, transmissibilidade e potencial zoonótico. De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), nas Américas, as Leishmanioses estão presentes em 18 países, sendo que o Brasil detém cerca de 96% dos casos de LV humana, caracterizando a patologia em transição epidemiológica (OPAS, 2018).

2.2 ETIOLOGIA DA DOENÇA

Tratando-se de uma doença tropical, ocasionada por um agente conhecido no Brasil por mosquito palha, um parasita intracelular, estimativas da OMS apontam que a Leishmaniose é a segunda doença transmitida por insetos que mais mata em todo o mundo, especialmente por se tratar de uma patologia negligenciada e subnotificada, o que dificulta e mascara a contabilização do número de casos de pacientes

infectados. Descrita inicialmente em regiões de clima tropical, semiárido e equatorial úmido, como é o caso do Nordeste brasileiro, o local de transmissão da Leishmaniose era predominantemente a zona rural e, com o aumento da migração para as cidades, a doença vem sendo cada vez mais percebida nos centros urbanos (BLANCO; NASCIMENTO-JUNIOR, 2017).

Embora haja semelhanças da Leishmaniose em diferentes regiões do mundo, os agentes etiológicos apresentam-se por meio de dois tipos de ciclos epidemiológicos: (a) antroponótico, identificado em países do subcontinente Indiano e leste Africano, com a infecção restrita à espécie *Leishmania donovani*, na qual o homem é o único hospedeiro vertebrado; (b) zoonótico, maior ocorrência em países da América do Sul, Oriente Médio, Ásia Central, China e Mediterrâneo, onde a infecção é promovida pela espécie *Leishmania infantum*, com uma transmissão dependente de um reservatório infectado, em especial, cães e raposas, de modo que o ser humano não representa uma fonte primária de infecção. (CARDOSO 2018)

Renzetti (2017) evidencia que, atualmente, são onze as espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e, no Brasil, foram identificadas sete espécies, dentre as quais seis são do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. De acordo com a autora, circulam no país três principais espécies: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e, nas regiões norte e nordeste, identificou-se as espécies *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg* e *Leishmania (Viannia) shawi*.

Cabe salientar que, mesmo em face de falhas de controle e subnotificações das Leishmanioses, o Brasil é o único país endêmico que segue as recomendações para controle da doença, estabelecidas pelo Ministério da Saúde (MS) e preconizadas pela OMS, mantendo e conduzindo regularmente um programa epidemiológico no combate à patologia por meio do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (MVCLV). As estratégias de controle comumente empregadas no país baseiam-se em uma melhor definição das áreas de transmissão ou de risco e vigilância da ocorrência de casos humanos ou caninos da doença, realizando-se estratificação epidemiológica e medidas de controle distintas para cada região, levando-se em consideração que a Leishmaniose se apresenta sob diferentes aspectos geográficos, climáticos e sociais (BRASIL, 2006).

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

Em relação ao status de endemicidade da Leishmaniose Visceral em todo o mundo, são seis os países que apresentam os maiores índices: Bangladesh, Índia, Nepal, Etiópia, Sudão e Brasil (CHAPPUIS *et al.*, 2007). No Leste da África e no subcontinente indiano, a enfermidade é causada pela espécie *Leishmania donovani*. Na Europa, Norte da África e da América Latina, a infecção é causada predominantemente pela *Leishmania infantum* (LUKES *et al.*, 2007; ALVAR *et al.*, 2012).

Essa importante infecção zoonótica, causada pela *Leishmania infantum*, é potencialmente fatal nas regiões da Europa, África, Ásia e América. Sendo o cão doméstico o principal reservatório da infecção humana e os flebotomíneos os vetores biológicos dessa doença protozoária, as estimativas de que essa doença se espalhe pela Europa chegam a 2,5 milhões de cães infectados somente na região sudeste dessa localidade. No caso da América, existe uma preocupação com o aumento das taxas de infecção em áreas da Venezuela e Brasil, onde verifica-se uma alta prevalência de infecção canina, associada com alto risco de doença humana (BANETH *et al.*, 2008).

Francino *et al.* (2006) adita que a Leishmaniose canina é endêmica em regiões do Oriente Médio, América do Sul e bacia do Mediterrâneo, onde a prevalência notável da infecção chega a 67%, embora a prevalência da doença seja apenas cerca de 10%. Os autores salientam ainda que o diagnóstico da doença é extremamente desafiador, principalmente em áreas endêmicas, em razão das inespecíficas e diversas manifestações clínicas, além da alta taxa de soroprevalência em cães subclínicos.

Manna *et al.* (2009) relatam que são 12 milhões de casos da antropozoonose Leishmaniose de pele, muco cutânea e formas viscerais, ocorrendo cerca de 500.000 todos os anos. Tratando-se de uma doença grave, animais sem tratamento farmacológico podem morrer, sendo imprescindível o uso de uma vacina para controlar a doença em cães e diminuir a infecção de *L. infantum* em humanos. Contudo, as técnicas sorológicas para detecção da doença não são completamente satisfatórias, haja vista que não tornam possível a discriminação entre doença e infecção assintomática.

Considerada a mais negligenciada de todas as doenças negligenciadas, a LV além de endêmica encontra-se em franca expansão em várias regiões urbanas, periurbanas e rurais do Brasil, América Latina, Europa e de outras áreas do mundo. Destaca-se o aparecimento da doença em países do Mercosul, considerados anteriormente como indenes para LV, cuja forma clínica de ocorrência principal era LTA. Neste contexto, temos o cenário epidemiológico atual da Argentina, país em que os casos de LV humana começaram a surgir a partir de 2005 e que nestes últimos anos não pararam de crescer, com aumento gradativo no número de casos e de óbitos mostrando assim a força de expansão e urbanização dessa doença (SALOMON; ORELLANO, 2005; SALOMON *et al.*, 2009).

De acordo com Megid (2016) no Brasil, a distribuição atual da doença abrange 19 estados. Nos últimos cinco anos ocorreram em média 3.500 casos, sendo a maioria na região Nordeste do país. Dados do MS (BRASIL, 2016) revelam que a incidência da LV o país é bastante alta, com uma média de dois casos por 100.000 habitantes por ano. O aumento da incidência e a expansão das áreas de transmissão vêm causando preocupação. Neste sentido, cerca de 70% de todos os casos de LV na América do Sul acontecem no Brasil. Entre 1999 e 2008, mais de 1/3 dos municípios brasileiros reportaram casos autóctones da Leishmaniose Visceral, com uma taxa de letalidade variado de 3,2% a 6,9% nos últimos dez anos.

No Brasil, seu controle é baseado em um tripé de ações, cujo resultado, surge apenas a médio ou longo prazo, e sem garantia de sucesso, na redução de LV Humana (LVH) e canina (PALATNIK-DE-SOUZA *et al.*, 2001; BRASIL, 2008). Para que o controle seja realmente eficaz, as medidas devem ser mantidas durante longo período e, mesmo assim, é frequente a reativação dos focos da doença, uma vez que o combate ao vetor não tem logrado sucesso (ALVAR *et al.*, 2004; 2012).

No que se refere às medidas para o controle da LV, o MS preconiza que deve haver um diagnóstico precoce da doença, a eliminação de cães infectados, a descontaminação local através do uso de inseticidas, além de atividades em educação em saúde. Entretanto, existem limitações da estratégia de rastreamento e eutanásia dos animais infectados por diversos fatores, dentre os quais destacam-se a demora entre a coleta da amostra e a retirada dos cães infectados, a não autorização da coleta de sangue dos animais, a baixa sensibilidade dos testes diagnósticos (assintomáticos), a recusa na entrega dos animais infectados (assintomáticos) e a ausência de vigilância nos municípios (LIMA JUNIOR, 2017).

2.4 O CICLO DE VIDA E TRANSMISSÃO DA LVC

De acordo com Vito (2019), em condições adequadas, o principal transmissor da *Leishmaniose chagasi* é o mosquito fêmea, que possuem um aparelho bucal adaptado para picar e sugar o sangue, sendo que as formas promastigotas metacíclicas movimentando-se livremente na probóscida do vetor são injetadas durante a picada. Aguiar e Rodrigues (2017) completam dizendo que os vetores pertencem à família *Psychodidae*, subfamília *Phebotominae*, conhecidas por flebotomíneos, mosquitos pequenos, de cor parda (mosquito palha), medem cerca de 0,5 cm de comprimento e caracterizados por um voo saltitante e manutenção de asas eretas, inclusive em repouso. Na fase larvária, o mosquito se desenvolve em ambientes terrestres úmidos, com matéria orgânica e baixa luminosidade e, na fase adulta, são capazes de se adaptar a diferentes locais.

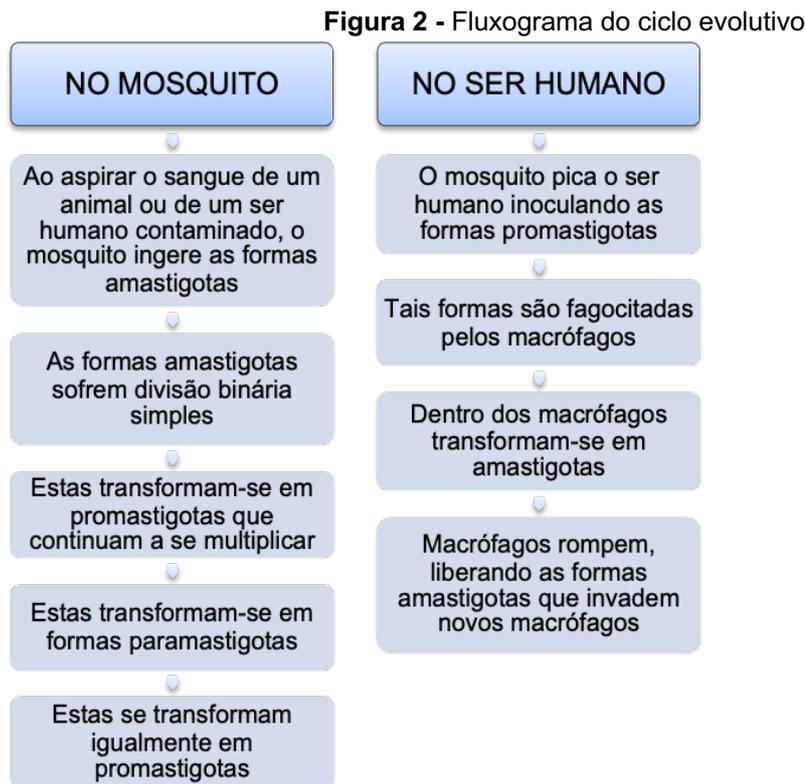
Sobre o ciclo de vida e transmissão, durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomídeo ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* que sofrem divisão binária, multiplicação e diferenciação em formas paramastigotas – estes colonizam o esôfago e a faringe do vetor, aderindo-se ao epitélio pelo flagelo – e diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas (formas infectantes) (SCHIMMING; PINTO E SILVA, 2012).

Acerca da etiologia, Aguiar e Rodrigues (2017) descrevem que, em geral, os promastigotas – forma infectante para os hospedeiros vertebrados, incluindo o ser humano – possuem forma losangular fina, entre 10 a 15 μ com longo flagelo na extremidade, com ampla mobilidade, enquanto as formas amastigotas normalmente são arredondadas ou ovoide sem a presença de flagelo livre, medindo entre 3 a 6 μ de diâmetro, sem flagelo exteriorizado.

Ainda de acordo com Schimming e Pinto e Silva (2012), o ciclo biológico completa-se com a picada do flebótomo infectado e imediata injeção de promastigotas do parasita na corrente sanguínea de um novo hospedeiro, sendo que as formas infectantes são liberadas na epiderme do hospedeiro e fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. Já no interior dos macrófagos, diferenciam-se em formas amastigotas e multiplicam-se excessivamente por divisão binária e repletos de amastigotas, os macrófagos enfraquecem e se rompem, liberando essas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo. Ocorre então a

disseminação hematogênica e linfática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário.

Para uma melhor compreensão do processo no mosquito e no ser humano, tem-se um fluxograma do ciclo evolutivo, como pode ser observado na Figura 2:



Fonte: Adaptado de Martins 2014

Como resultado desses processos, ocorre a multiplicação das formas amastigotas e produção de um processo inflamatório e atração de novas células ao local, originando a formação de um nódulo chamado de leishmanioma, composto por linfócitos e macrófagos. Dessa forma, a infecção se espalha para linfonodos, baço e medula óssea nas primeiras horas após a picada, embora a manifestação patológica apresente-se de maneira lenta, sendo considerada sistêmica severa, com o órgão afetado de acordo com a resposta imune do hospedeiro (SCHIMMING; PINTO E SILVA, 2012).

2.4.1 A importância do cão como reservatório do parasito

No Brasil existem entre 20 a 30 milhões de cães domésticos, de maneira que estes têm papel fundamental na transmissão LVC e, quando infectados, podem manifestar sintomas da doença ou permanecer assintomáticos, embora continuem a ser fontes para os vetores que irão transmitir os parasitas para o ser humano. A detecção precoce tem fundamental importância para impedir que a doença se espalhe, pois o país encontra-se em situação endêmica de LV humana e canina desde 1980 que, sem tratamento adequado, pode ocasionar a morte (ROLIM *et al.*, 2016).

Causadas por protozoários do gênero *Leishmania infantum*, a LVC pode se manter hospedado em animais silvestres carnívoros, como lobos, raposas, coiotes, gambás, cachorro-do-mato, equídeos e roedores, mas os cães domésticos são considerados no ciclo urbano de transmissão os principais reservatórios. O mosquito palha, pertencente à família dos flebotomídeos *Leishmania infantum* é o vetor da LVC, tendo como ambiente propício de reprodução os locais úmidos, com baixa luminosidade e com muita matéria orgânica em decomposição. Assim, os programas de controle têm como foco a eliminação dos reservatórios (cães e vetores), com vistas a reduzir os casos fatais (COSTA, 2011 apud SCHIMMING; PINTO E SILVA, 2012).

É consenso na literatura que praticamente todos os cães desenvolvem doença visceral ou sistêmica, de modo que, em torno de 90% apresentam ainda algum envolvimento cutâneo. Com uma maior quantidade de parasitas na pele se comparado ao ser humano, os cães têm favorecida a infestação por vetores e, comumente, observa-se como sinais viscerais o aumento dos linfonodos, emagrecimento e perda de massa muscular, sinais de insuficiência renal (poliúria, polidipsia, vômito), dentre outros sinais clínicos, como aumento do baço e febre. Sinais cutâneos envolvem hiperqueratose, pelagem seca/quebradiça, queda contínua de pelos e unhas excessivamente longas ou quebradiças/deformadas, desnutrição e paralisia de partes posteriores (SCHIMMING; PINTO E SILVA, 2012).

Costa (2018) enfatiza que são fatores de risco para infecção e desenvolvimento de sintomas em cães o estado nutricional e imunológico, a susceptibilidade genética, além de questões relacionadas ao meio. Não são determinantes para a doença fatores como sexo, idade, raça, porte ou tamanho do pelo, embora tais características influenciem no grau de exposição dos cães ao vetor, pois raças grandes, por exemplo,

podem ter o risco de infecção aumentado quando deixados em quintais como cães de guarda e, dessa forma, expostos a picadas do mosquito transmissor. Em relação ao tamanho do pelo, a autora refere que cães de pelos curtos, com maior superfície de contato, ficam mais expostos a picadas do vetor, além de apresentarem uma maior produção de CO², atraindo mais vetores em comparação ao cão de pelos longos.

Tolezano *et al.* (2007) acrescentam que, embora o cão seja considerado o principal reservatório de infecção da LVC, há evidências de que, em determinadas áreas do Brasil, o ser humano pode servir como fonte de infecção. Haja vista se tratar de uma doença parasitológica emergente no país no final dos anos 90, ela foi sinalizada no ano de 1997 no Nordeste e se espalhou para outras localidades. O saldo do vetor descoberto nesse período (*Lutzomyia longipalpis*) ocasionou, no ano de 1999, a morte de uma criança nessa região.

2.5 SINAIS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO DA LVC

Fontes e Silva (2011) apontam para consequências e sintomas variados da LVC, uma vez que cães podem apresentar sintomas da infecção, ocasionando sua morte, ou permanecer assintomáticos, com um ou mais sintomas brandos. Frequentemente, observa-se ulcerações na ponta das orelhas, despigmentação, erosão e ulceração do focinho, unhas com crescimento anormal e quebradiças, emagrecimento ou desnutrição, atrofia muscular, perda de resistência física, sonolência e apatia, febre intermitente e linfadenopatia. Além disso, os animais podem apresentar anemia, lesão ocular e alterações oftalmológicas, sede excessiva, problemas gastrointestinais e inflamações renais, esta última considerada a principal causa de óbito em cães com LV.

Acerca do período de incubação, existe uma variação tanto em cães como em humanos. No cão, o período de incubação pode variar de três meses a alguns anos, embora a média seja entre três a sete meses e, no caso do homem, esse tempo pode variar de dez dias a vinte e quatro meses, com média de dois a seis meses. São meios para realizar o diagnóstico em seres humanos o teste sorológico *Immunofluorescence Antibody Test* (IFAT). Em cães, além do teste IFAT, tem-se o teste *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e a identificação microscópica de áreas aspiradas

(baço, medula óssea, linfonodos e esfregaço sanguíneo) (SOUZA e SILVA; WINK, 2018).

Acerca do período de incubação da LVC, Molina *et al.* (1994) relatam que pode haver uma variação entre 2 e 12 meses, embora uma forma subclínica experimental tenha relatado uma duração de 25 meses. Em sua fase inicial, a doença em cães apresenta alargamento dos gânglios linfáticos poplíteos e, posteriormente, o animal apresenta perda de apetite, desenvolve dermatite escamosa na região do focinho e periocular, além de depilação, onicogripose, ceratoconjuntivite, ulcerações, epistaxe, alopecia, enrijecimento das pernas traseiras e caquexia, ocasionando, por fim, a morte do animal.

Sobre achados dermatológicos, Azevedo (2019) salienta que a forma cutânea clássica da LVC se apresenta por meio de uma dermatite esfoliativa não pruriginosa, comum na região periocular, ponte nasal e borda dos pavilhões auriculares, embora possa se difundir por todo o corpo do animal. São comuns ainda áreas de rarefação pilosa ou alopecia, com presença de pápulas eritematosas, além de dermatite ulcerativa e, esporadicamente, verifica-se o surgimento de dermatite nodular e dermatite papular. Em casos menos frequentes, os pacientes podem apresentar alterações hepáticas, cardíacas e neurológicas, mas, de maneira geral, apesar de todas as alterações clínicas possíveis, grande parte dos cães infectados permanecem assintomáticos, embora mantenham capacidade infectiva ao vetor.

Ainda na concepção de Azevedo (2019), acerca dos achados laboratoriais, são frequentemente observadas alterações bioquímicas: hiperproteinemia (hiperglobulinemia), hipoalbuminemia, aumento da atividade de enzimas hepáticas e azotemia e, em animais que apresentam doença renal, verifica-se constantemente a proteinúria relacionada à glomerulonefrite. Em decorrência de doença inflamatória crônica, identifica-se em muitos cães uma anemia não regenerativa, disfunção (hipoplasia ou aplasia) da medula óssea com eritropoiese reduzida em decorrência do parasitismo neste local, resultante da doença renal crônica e diminuição da produção de eritropoietina, além de um aumento da hemólise pelo baço e fígado, associado a uma resposta à infecção por *L. infantum*.

No Quadro 1, de maneira geral, tem-se os órgãos envolvidos e as lesões decorrentes da disseminação do protozoário *Leishmania chagasi* pelo organismo no cão (SOUZA E SILVA; WINK, 2018).

Quadro 1 – Órgão e Lesões envolvidos

ÓRGÃO	LESÃO
Fígado	Inflamação granulomatosa, hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer.
Órgãos linfoides	Proliferação linfoplasmohistiocitária, linfadenomegalia generalizada; linfonodos hipertróficos.
Medula óssea	Hipertrofia e hiperplasia das células medulares.
Baço	Granulomas, inflamação crônica e difusa.
Coração	Inflamação linfohistioplasmocitária, miocardite, necrose, e degeneração das fibras miocárdicas.
Rins	Deposição de imunocomplexos nos glomérulos, glomerulonefrite, nefrite intersticial e perda da função renal.
Olhos	Deposição de imunocomplexos. Ceratoconjuntivite, blefarite, uveíte, edema de córnea e sinéquias.
Intestino delgado/grosso	Inflamação da camada mucosa, causa ulcerações, colite ulcerativa e erosiva.
Sistema nervoso	Inflamação meníngea, causando sinais clínicos neurológicos.
Pulmões	Pneumonia intersticial crônica e difusa.
Ossos	Lesões osteolíticas e osteoproliferativas de diáfises ósseas.
Sistema genital	Orquite intersticial linfoplasmocítica difusa e epididimite linfohistiocitária focal. Parasitas podem ser encontrados na mucosa uretral e prepúcio.

Fonte: Adaptado de Silva 2017

Para que sejam realizadas ações de controle, faz-se necessário o diagnóstico da LVC para a eliminação dos reservatórios e, embora existam diversos métodos imunológicos e moleculares, os métodos diagnósticos atuais são imprecisos e apresentam baixa sensibilidade ou especificidade, insuficientes para identificação de cães infectados. A detecção sorológica precoce é bastante recomendável, tendo em vista a alta prevalência de cães infectados em áreas urbanas, sendo os métodos sorológicos convencionais que detectam anticorpos os mais utilizados, embora recomende-se o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos para a infecção canina, em especial em animais assintomáticos (FARIA *et al.*, 2015).

Teixeira (2019) esclarece que uma escala de sinais clínicos vem sendo utilizada por pesquisadores como ferramenta auxiliar de diagnóstico e prognóstico, especialmente em regiões isoladas, com dificuldades de acesso a técnicas

diagnósticos. Testes laboratoriais de rotina, dentre os quais dosagem de proteínas da fase aguda ou avaliação de proteinúria, também são empregados para monitorar o tratamento específico e o prognóstico desses cães. Contudo, doenças simultâneas com outras etiologias podem influenciar no desenvolvimento de sinais e, por isso, não se recomenda que o diagnóstico seja realizado com embasamento exclusivo por sinais clínicos identificados.

Segundo Teixeira (2019, p.23) “uma prova diagnóstica ideal deve ser de execução simples e acurácia elevada, comprovada consistentemente em mais de um estudo e nos diversos cenários onde o diagnóstico se faz necessário”, embora isso não se aplique aos testes para LVC comercializados ou em laboratórios de pesquisa, mesmo em face da diversidade de técnicas, como pode ser verificado no Quadro 2:

Quadro 2 – Técnicas diagnósticas LVC

TESTES SOROLÓGICOS	PARASITOLOGIA	DETECÇÃO DE DNA
Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	Pesquisa direta (esfregaço de pele, aspirados de baço, medula óssea, linfonodo, entre outros).	Reação da cadeia da polimerase – PCR com diferentes tipos de iniciadores (convencional ou quantitativa)
Imunofluorescência indireta - IFI	Histopatologia	Hibridização com sondas específicas
Teste de aglutinação direta (DAT)	Imunohistoquímica	Hibridização com sondas específicas
Imunocromatográficos rápidos	Cultura do parasito	-

Fonte: Adaptado de TEIXEIRA (2019, p.24)

Embora as técnicas moleculares apresentem elevada acurácia, o custo destas também é demasiadamente alto, o que torna um desafio a aplicação de métodos diagnósticos em áreas endêmicas de países em desenvolvimento. Quanto a utilização das técnicas imunocromatográficas, o MS substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC, utilizado o Teste Imunocromatográfico DPP (*Dual Path Platform*, Biomanguinhos) como teste de triagem e o ELISA® - (Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina - Biomanguinhos) como teste confirmatório, no lugar da reação de imunofluorescência indireta - Biomanguinhos (RIFI®). Entretanto, falhas nestes resultados podem ocasionar a eliminação de animais que não estão infectados ou, em

casos positivos, favorecer a disseminação da doença (FARIA; ANDRADE, 2012; SILVA *et al.*, 2016).

Araújo e Costa (2018) afirmam que o diagnóstico da LVC é complexo e desafiador em função da inexistência de testes 100% sensíveis e específicos.

2.6 PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA LVC

Da mesma forma como é necessário realizar um diagnóstico eficiente de LVC, medidas de prevenção e tratamento para a o controle da doença tem grande importância e, dentre as medidas adotadas para interromper o ciclo de transmissão do parasito em regiões endêmicas, tem-se o uso de inseticidas impregnados em coleiras, adoção de medidas preventivas no animal e no ambiente, diagnóstico precoce, tratamentos à base de drogas, vacinas, redução do contato homem-vetor, identificação e eliminação de reservatório canino e educação em saúde (SILVA, 2017).

Em relação ao tratamento, o uso da quimioterapia utilizada para tratar animais infectados, embora apresente inúmeros efeitos colaterais, é bastante empregada por promover a redução da prevalência e incidência da doença, levando uma quebra no ciclo de transmissão do patógeno. Países que permitem o tratamento de cães infectados utilizam fármacos para o tratamento, sendo que o sucesso da terapia depende de fatores como o estado clínico e imunológico do animal, atentando-se para as funções renal e hepática, aspectos hematológicos e carga parasitária (SILVA, 2017; REGUERA *et al.*, 2016).

Recentemente, uma nova droga baseada em miltefosina (Milteforan® Virbac) teve seu registro autorizado na nota técnica conjunta nº001/2016 – MAPA/MS para o uso veterinário, no tratamento de LVC. A Miltefosina apresenta um diferente modo de ação, com base em uma atividade antiparasitária direta, além de não depender de sistema imunológico funcional, pode ser utilizada como terapia combinada, apresentando facilidade de administração, por via oral, e baixa toxicidade. VIDES e MORAES (2018).

3 JUSTIFICATIVA

Os principais fármacos escolhidos para o tratamento das Leishmanioses têm sido até hoje os antimoniais pentavalentes (Sb5+). Herwalds (1999) apud Roatt (2013) salienta que ainda não foi desenvolvida uma terapia ideal para as Leishmanioses, embora essa classe de fármacos apresenta-se como a mais barata opção terapêutica disponível.

Apesar de sua comprovada eficácia, tais fármacos apresentam importantes problemas, dentre os quais efeitos colaterais graves (hepatotóxicos, nefrotóxicos e cardiotoxicos), períodos estendidos de terapia, administração parenteral e efetividade diminuída devido à resistência de cepas em determinadas regiões do planeta, como Bihar na Índia, onde aproximadamente 60% da população apresenta falha terapêutica com o uso do medicamento. Em virtude dos efeitos tóxicos graves, os antimoniatos não são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da Leishmaniose em pacientes nos EUA.

Isto posto, a avaliação de propostas biotecnológicas inovadoras em terapêutica imunofarmacológica que possam ser empregadas no tratamento da LVC torna-se fundamental. Neste sentido, a proposta do presente trabalho concerne à avaliação da imunoterapia, utilizando uma vacina terapêutica composta por antígenos totais de *L. amazonensis* no tratamento de cães naturalmente parasitados por *L. infantum*.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar um protocolo imunoterapêutico comparando dois grupos de animais positivos para LVC, um grupo utilizando somente a vacina LaSap e outro utilizando LaSap associada ao Alopurinol.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o tratamento de cães naturalmente parasitados por *L. infantum*, com uma formulação vacinal contendo antígenos totais de *L. amazonenses* e comparar esse tratamento com outro grupo utilizando a formulação vacinal associada com o Alopurinol;

- Avaliar a inocuidade e toxicidade do protocolo terapêutico, observando os exames sanguíneos, bioquímicos e possíveis reações adversas locais ou sistêmicas;

- Avaliar a redução da carga parasitária de *L. infantum* após o tratamento comparando os dois grupos por meio do exame de qPCR;

- Realizar o acompanhamento pós-tratamento dos animais, avaliando a carga parasitária em diferentes órgãos (pele e medula), visando analisar a efetividade real do produto.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Em relação aos grupos experimentais, foi selecionada uma amostra com nove (9) cães sintomáticos naturalmente parasitados com *L. infantum*. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo tratado com imunoterápico LaSap (Antígenos totais de *L. amazonensis* mais saponina) seguido da administração do Alopurinol (n= 4) seguindo o protocolo do fabricante e grupo tratado unicamente com o imunoterápico LaSap (Antígenos totais de *L. amazonensis* mais saponina) (n= 5). Todos os animais passaram por uma bateria de análises clínico-laboratoriais antes do início dos tratamentos e cães que já passaram por algum tipo de tratamento contra Leishmaniose anteriormente foram excluídos do experimento. Todos os cães foram estabelecidos como positivos para LVC com base no protocolo oficial brasileiro, sendo positivos no teste rápido DPP e ELISA. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da UNILA (Universidade federal da Integração Latino-Americana antes de ser iniciado). Outrossim, todos os animais pertencem aos proprietários residentes na cidade de Foz do Iguaçu-PR, região com prevalência e incidência de LVC acima de 20% nos últimos três anos. Todos os proprietários assinaram um termo de consentimento para dar continuidade à realização do projeto.

5.2 CULTIVO DOS PARASITOS PARA GERAÇÃO DE ANTÍGENOS TERAPÊUTICOS

Foram utilizadas espécies de *L. amazonensis* (Cepa PH-8). Esta cepa foi cultivada em meio alpha-MEM (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA), acrescido de penicilina (200U/mL) e estreptomicina (100µg/mL), em pH 7,4 e temperatura de incubação de 23°C. Os parasitos empregados nos testes foram removidos da cultura em fase estacionária, até a décima passagem.

A cultura foi removida em capela de fluxo laminar e transferida para tubos estéreis de polipropileno de 50 mL (Falcon, Becton Dickinson, EUA), que foram

submetidos à centrifugação a 900 x g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado mais 30ml de PBS estéril. O procedimento foi realizado por duas vezes. Posteriormente, a massa antigênica foi sonicada em ultrassom com 5 pulsos de 1 minuto a 40 watts. Após este procedimento, o antígeno foi dosado e sua concentração proteica estabelecida pelo método de Lowry *et al.* (1951) e armazenado em freezer - 80°C. (VIANA *et.al* 2018)

5.3 PROTOCOLO TERAPÊUTICO

Todos os cinco (4) animais do grupo LaSap com Alopurinol receberam três doses da LaSap via subcutânea cada dose continha 300 microgramas de antígeno associado a 300 microgramas do adjuvante saponina, em um volume total de 1ml de solução com intervalo de sete dias entre elas e após a terceira dose o tratamento com o Alopurinol (10 mg/kg 2x ao dia) seguindo a recomendação do fabricante.

Os cinco (5) animais do grupo LaSap receberam três doses por via subcutânea com intervalo de sete dias entre elas, após essas três doses semanais foi administrada uma dose a cada trinta dias por três meses (três aplicações). Cada dose continha 300 microgramas de antígeno associado a 300 microgramas do adjuvante saponina, em um volume total de 1ml de solução. Todos os animais, de ambos os grupos, foram avaliados durante o tratamento e por 60 dias (dois meses) após o término do mesmo, verificando seu estado clínico geral. Foram realizados em três tempos distintos: T0 no início do tratamento, T1 após as três doses semanais iniciais e T2 no final do acompanhamento, trinta dias após as 3 doses com intervalos mensais .

5.4 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA

Para realizar a avaliação do perfil hematológico, foi utilizado o aparelho Auto Hematology Analyzer (Mindray BC-2800 Vet, Hamburgo, Alemanha) para a análise global de leucócitos, eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e plaquetas. O leucograma foi determinado pelo aparelho hematológico em número de leucócitos/mm³. A contagem diferencial de células foi realizada através de esfregaços sanguíneos

corados com Panótico Rápido InstantProv (Newprov®) e avaliada por microscopia óptica em objetiva de imersão.

Assim, foi determinada a contagem diferencial de leucócitos e obtido o número absoluto de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina. As avaliações bioquímicas foram realizadas nas seguintes análises: prova de função renal a partir da dosagem de ureia e creatinina; provas de função hepática, compreendendo a dosagem das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA). Para estas análises, utilizou-se o sistema bioquímico automático (CELM SBA-200, Barueri, SP, Brasil) e empregado Kits comerciais do Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo o método descrito pelo fabricante.

5.5 SOROLOGIA ANTI-LEISHMANIA

Para a realização dos testes de ELISA, foi utilizado antígeno solúvel de promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46), cultivados por sete dias no meio LIT, conforme descrito por Giunchetti (2007). Para os testes de ELISA, 2 µg/poço do antígeno solúvel de promastigotas de *L. chagasi* (SLcA) foram utilizados para sensibilização das placas de 96 poços (MaxiSorp™, Nalge Nunc Intl. Rochester, NY, USA). Amostras de soros dos diferentes grupos de cães avaliados foram submetidas ao teste imunoenzimático (ELISA), conforme técnica descrita por Voller (1978) e segundo protocolo descrito por Giunchetti (2007), empregando-se conjugado HRPO específicos para cão, anti-IgG total (Bethyl laboratories, Inc Montgomery – Texas, EUA).

A diluição ótima dos conjugados foi determinada por titulação, empregando-se soros padrões positivos e negativos. As amostras de soro foram testadas na diluição de 1:100. A leitura foi realizada em leitor automático de microplaca Multiskan® MCC 340 (Labsystems, Helsinki, Finland), utilizando o comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica de cada grupo nos diferentes tempos avaliados.

5.6 ANÁLISES DA CARGA PARASITÁRIA DA PELE POR PCR EM TEMPO REAL

A técnica de PCR em Tempo Real foi utilizada para diagnosticar e quantificar DNA de *Leishmania infantum* nas amostras coletadas, foi coletada uma amostra de pele em ponta de orelha do animal através de um Punch 5mm KOLPLAST® e medula óssea com uma agulha 40x12 com uma seringa de 20 ml na tuberosidade coxal da asa ilíaca, todas as coletas foram realizadas após protocolo anestésico com Dexmedetomidina 3 mcg/kg, Cetamina 1 mg/kg, Metadona 0,2 mg/kg e, se necessário, Propofol dose efeito, e as amostras retiradas de pelo e medula foram congelados a -80°C em tampão T.E (Tris-EDTA) na proporção de 1:1 v/v. Para extração do DNA das diferentes amostras será utilizado o kit WIZARD® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), conforme recomendação do fabricante. A PCR em Tempo Real será realizada utilizando o kit SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems). As análises foram realizadas utilizando aparelho ABI7300 (Applied Biosystems). O primer relacionado ao gene de referência HPRT1 (Peters *et al.*, 2007) foi utilizado com o objetivo de verificar a integridade das amostras de DNA extraídas da pele dos cães.

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as variáveis com distribuição paramétrica, foi utilizada a análise de variância (ANOVA). As análises foram feitas com o software Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc.). Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS CLÍNICOS

De modo geral, todos os animais, de ambos os grupos, apresentaram uma melhora em seus sintomas clínicos após o tratamento com o imunoterápico LaSap. As lesões de pele provocadas pela Leishmania que acometiam os animais, como a onicogribose, dermatite esfoliativa nas regiões periocular, ponte nasal, pavilhões auriculares e corpo, juntamente com as áreas de rarefação pilosa e alopecia, diminuíram significativamente a partir de terceira dose inicial do tratamento como pode ser verificado nos quadros 3 e 4. Ademais, nenhum animal apresentou recidiva dos sintomas até o término do acompanhamento.

Quadro 3 – Evolução dos sinais clínicos atribuídos a LVC nos animais do grupo vacina de acordo com os tempos T0 (antes do início do tratamento), T1 (após as aplicações semanais) e T2 (no final do tratamento)

Grupo Vacina (LaSap)			
Vacina	T0	T1	T2
Animal 1	Dermatite esfoliativa em todo o corpo, alopecia em toda a região ventral, onicogribose, rarefação pilosa e emagrecimento	Leve dermatite esfoliativa em pavilhão auricular e ponte nasal e alopecia em região ventral com início de crescimento de pelos	Alopecia em região ventral com crescimento de pelos
Animal 2	Dermatite esfoliativa em ponta de orelha e região nasal, hipotricose em todo o corpo e descamação	Leve dermatite esfoliativa em ponta de orelha e descamação	Leve dermatite esfoliativa em ponta de orelha
Animal 3	Hipotricose, onicogribose, descamação pelo corpo	Hipotricose	Hipotricose
Animal 4	Dermatite esfoliativa em região periocular e região nasal	Sem sintomas	Sem sintomas
Animal 5	Alopecia em região periocular e diversos locais do corpo	Sem sintomas	Sem sintomas

Fonte: Dados da pesquisa (2021)

Quadro 4 – Evolução dos sinais clínicos atribuídos a LVC nos animais do grupo vacina + alopurinol de acordo com os tempos T0 (antes do início do tratamento), T1 (após as aplicações semanais) e T2 (no final do tratamento)

Grupo Vacina (LaSap) + Alopurinol			
Vacina	T0	T1	T2
Animal 1	Descamação em todo o corpo, onicogribose, dermatite em região auricular	Dermatite descamativa	Sem sintomas
Animal 2	Caquexia, Hipotricose, descamação	Melhora da condição corporal, hipotricose	Hipotricose
Animal 3	Hipotricose, onicogribose, descamação pelo corpo	Hipotricose	Hipotricose
Animal 4	Dermatite esfoliativa em região nasal	Sem sintomas	Sem sintomas

Fonte: Dados da pesquisa (2021)

6.2 VALORES HEMATOLÓGICOS

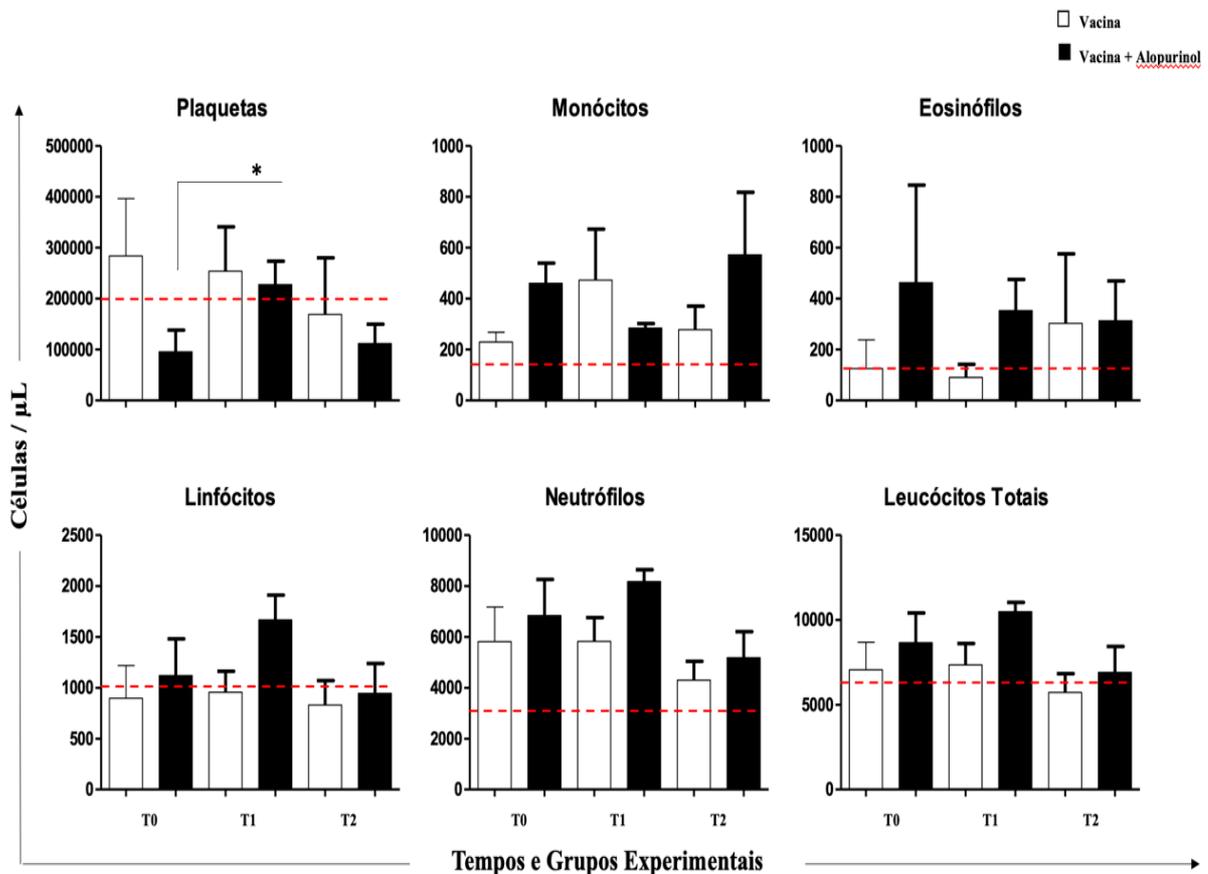
Os valores hematológicos das plaquetas nos animais do Grupo Vacina indicaram uma redução da quantidade de plaquetas ao longo do tratamento, diferente do grupo Vacina + Alopurinol onde, em T1, houve um aumento significativo e, em T2, um decréscimo, mas mantendo o valor acima do T0.

Os valores hematológicos de Monócitos no grupo Vacina tiveram uma elevação entre o tempo T0 e T1 e, em T2, houve uma redução, mas se mantendo acima dos valores de referência. O grupo Vacina + Alopurinol apresentou uma redução entre T0 e T1, porém, um aumento significativo em T2. Os valores hematológicos de Eosinófilos no grupo Vacina apresentou uma diminuição entre T0 e T1, porém, um aumento significativo entre T1 e T2. Já no grupo Vacina + Alopurinol, ocorreu uma diminuição dos valores hematológicos ao longo do tratamento.

Os valores hematológicos de Linfócitos, Neutrófilos e Leucócitos do grupo Vacina não apresentaram diferenças estatísticas entre T0 e T2, o que não foi observado no grupo Vacina + Alopurinol, onde ocorreu um aumento de seus valores em T1.

Na Figura 3, tem-se a apresentação dos tempos dos grupos experimentais:

Figura 3 – Análises leucocitárias de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e submetidos aos dois protocolos de tratamento (LaSap em branco e LaSap + Alopurinol em preto) nos três tempos T0 (antes do início do tratamento), T1 (após as aplicações semanais) e T2 (final do tratamento). As linhas tracejadas em vermelho indicam os limites mínimos dos valores de referência. As linhas conectoras indicam diferença estatística $P \leq 0,05$



Fonte: Dados da pesquisa (2021)

6.3 VALORES BIOQUÍMICOS

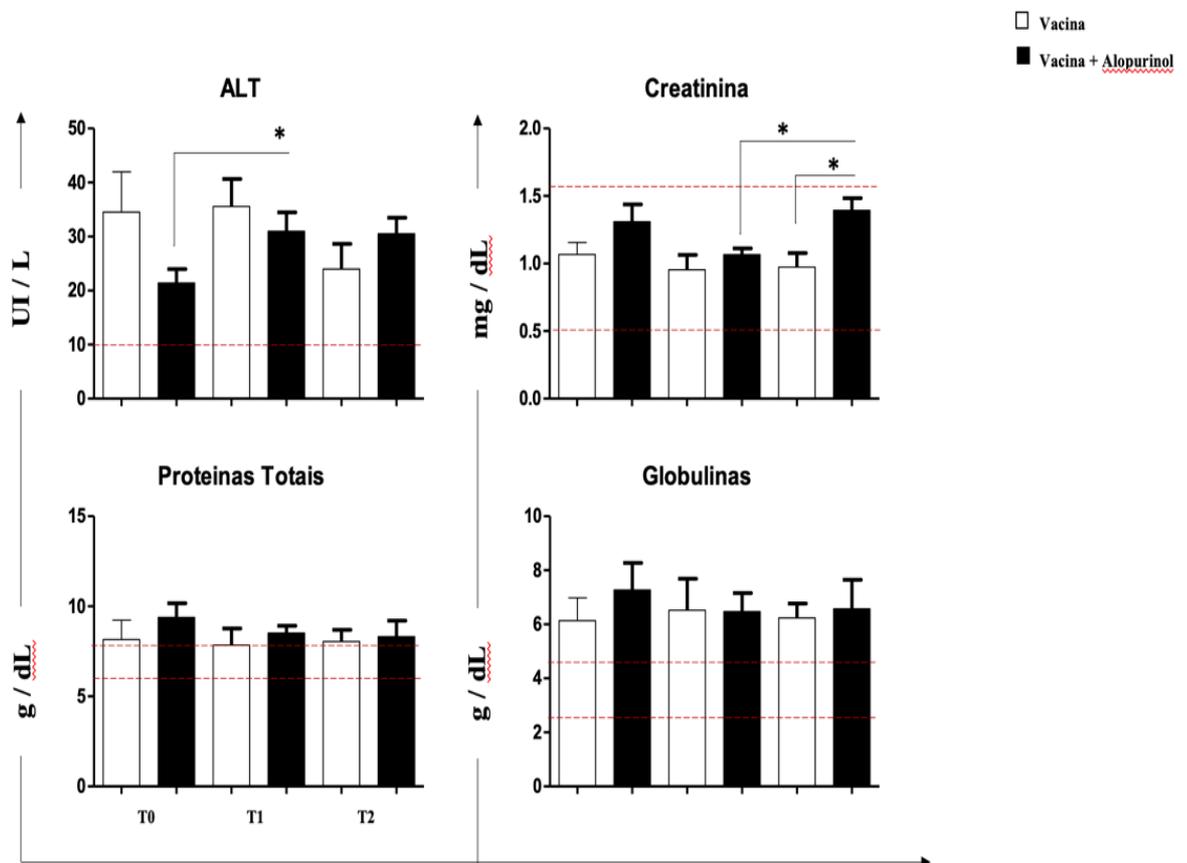
As análises bioquímicas ocorreram do mesmo modo que as hematológicas, sendo efetuados exames em três períodos diferentes: T0 no início do tratamento, T1 após as três aplicações iniciais e T2 final do tratamento

Os valores bioquímicos de ALT do grupo Vacina não demonstraram diferenças estatísticas entre T0 e T1, com um apresentando um decréscimo em T2. No grupo

Vacina + Alopurinol, ocorreu um aumento entre T0 e T1 e o valor não sofreu diferença entre T1 e T2. Os valores bioquímicos de Creatinina se mantiveram dentro dos parâmetros normais e sem variação estatística no grupo Vacina, tendo o mesmo ocorrido no grupo Vacina + Alopurinol, com um pequeno decréscimo em T1.

Os valores de Proteínas Totais e Globulinas se mantiveram sem alterações estatísticas durante todo o acompanhamento. Tais informações estão dispostas na Figura 4:

Figura 4 – Análises bioquímicas de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e submetidos aos dois protocolos de tratamento (LaSap em branco e LaSap + Alopurinol em preto) nos três tempos T0 (antes do início do tratamento), T1 (após as aplicações semanais) e T2 (final do tratamento). As linhas tracejadas em vermelho indicam os limites mínimos e máximos dos valores de referência.



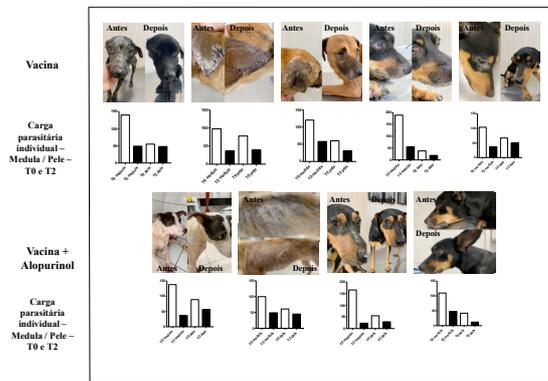
Fonte: Dados da pesquisa (2021)

6.4 CARGA PARASITÁRIA

A Vacina terapêutica LaSap induziu uma acentuada redução de carga parasitária na medula e uma redução mais discreta na carga parasitária da pele em todos os animais testados. As análises de qPCR de medula e biópsia de pele indicaram tal redução na medula em entre o grupo vacina em T0 e T2 $P=0,038$ ($36,6\pm 10,0$) ente os grupos vacina + alopurinol em T2, $P=0,01$, ($47,0\pm 33,7$).

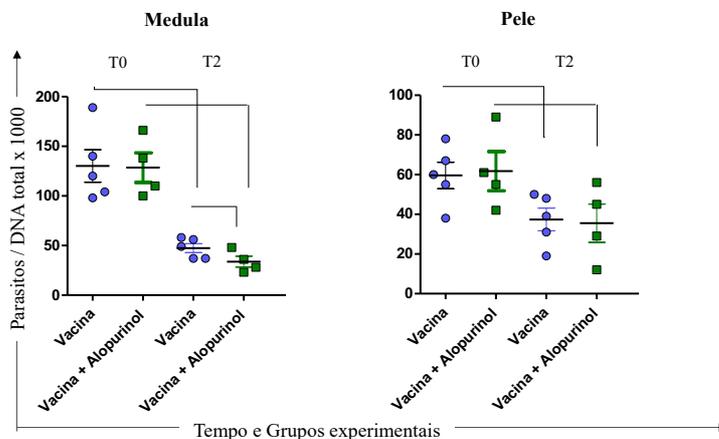
Na pele, não houve diferenças estatísticas ente os dois grupos em T2, somente no grupo vacina em T0 e T2 $P=0,01$ ($14,8\pm 12,7$) e grupo vacina + alopurinol em T0 e T2, $P=0,05$ ($19,8\pm 19,1$), conforme demonstrado na Figura 5:

Figura 5 – As análises de carga parasitária através de qPCR de cada animal estudado de medula e biópsia de pele e medula entre o grupo vacina em T0 e T2 e ente os grupos vacina + alopurinol em T0 e T2



Fonte: Dados da pesquisa (2021)

Figura 6 – Análises em grupo da carga parasitária de medula e pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e submetidos aos dois protocolos de tratamento (LaSap ou LaSap + Alopurinol) nos tempos T0 (antes do tratamento) e T2 (30 dias após tratamento)



Fonte: Dados da pesquisa (2021)

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram utilizados cães naturalmente infectados por *L. infantum*, que apresentavam sintomatologia clínica com pelo menos três sinais clínicos relacionados a LVC. Cabe salientar que todos os animais do experimento estão sob tutela de Organizações Não Governamentais (ONGs) de proteção animal da cidade de Foz do Iguaçu – PR.

Os cães foram divididos em dois grupos: grupo vacina e grupo vacina associado ao alopurinol. Os cães de ambos os grupos receberam três doses da vacina LaSap, com intervalo de sete dias entre cada dose e, assim que foi realizada a terceira dose, eles foram divididos em um subgrupo, que ficou recebendo apenas uma dose mensal da vacina LaSap. No outro grupo, que recebeu somente a medicação alopurinol 10 mg/kg, via oral, duas vezes ao dia, o objetivo do trabalho foi verificar a diferença entre os protocolos de tratamento, comparando a carga parasitária, perfil hematológico e bioquímico, antes e após os tratamentos.

O protocolo terapêutico da LVC é o uso da Miltefosina, princípio ativo do Milteforan, o qual apresenta efeito tóxico sobre os protozoários da *Leishmaniose infantum*. Outros medicamentos podem ser associados ao Milteforan, dentre os quais o Alopurinol, que interrompe a síntese proteica do parasito, resultando na inibição da sua multiplicação e na morte (Jericó *et al.*, 2015). Trata-se de um protocolo considerado eficaz, reduzindo consideravelmente a carga parasitária, embora não seja acessível para a maioria da população devido ao seu alto custo (Lisboa *et al.*, 2018). Cabe ainda ressaltar que já existem artigos indicando resistência dos parasitas a esse tratamento (PROVERBIO, 2014; YASUR-LANDAU *et al.*, 2016; CROFT, SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Nascimento *et al.* (2018) realizaram uma pesquisa a curto prazo (90 dias) com o Alopurinol, sozinho ou em combinação com uma vacina Leish-F2, formulada com um adjuvante agonista de receptor do tipo Toll-Like (TRL) TLR4 (SLA-SE). O estudo foi realizado com 28 cães naturalmente infectados por *L. infantum*, dentro de um canil de experimentação, divididos em 3 grupos: os que não receberam o tratamento, os tratados com alopurinol via oral sozinho ou alopurinol com o antígeno Leish-F2 (SLA-SE). Após os 90 dias, verificou-se que o grupo de animais não tratados tiveram um declínio progressivo de sua condição clínica e um aumento em seus níveis de infecção, ao tempo em que os cães tratados somente com o alopurinol aliviou os

sintomas de LVC, mas não gerou redução sustentada dos parasitas. O protocolo do alopurinol associado a Leish-F2 (SLA-SE) melhorou a condição clínica e proporcionou a eliminação a longo prazo de *L. infantum* dos tecidos linfoides e órgãos sistêmicos. Trata-se de um protocolo considerado eficaz, reduzindo consideravelmente a carga parasitária, embora não seja acessível para a maioria da população devido ao seu alto custo (Lisboa *et al.*, 2018). Cabe ainda ressaltar que já existem artigos indicando resistência dos parasitas a esse tratamento (PROVERBIO, 2014; YASUR-LANDAU *et al.*, 2016; CROFT, SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Um estudo realizado por Travi e Miró (2018) verificou que médicos veterinários tem aplicado o protocolo da Miltefosina com o Alopurinol, associado a Domperidona, que é um derivado do benzimidazol com atividade antagonista seletiva do receptor D2 da dopamina. Esse fármaco induz um aumento do nível sérico de prolactina como efeito secundário, a prolactina estimula a imunidade celular (Th1) aumentando a produção de INF- γ , IL2 e TNF- α . Os autores concluíram que o uso de domperidona sugere que os cães se beneficiam dos seus efeitos imunomoduladores, levando à proteção contra a infecção por *L. infantum* ou melhora do estado clínico. Contudo, deve-se fazer uso do fármaco com cautela, avaliando os riscos de efeitos colaterais relacionados à idade, raça, interações medicamentosas, endocrinopatias concomitantes e aptidão cardíaca devido a efeitos colaterais em humanos.

O estudo de Gómez-Ochoa (2009) indicou que a domperidona melhorou de modo significativo a condição clínica de 70 cães infectados naturalmente por LVC. Nesse mesmo estudo, foi observado em 86% dos cães doentes uma melhora clínica, acompanhada por níveis de anticorpos estáveis em 57,1% dos animais. Os animais foram acompanhados por 90 dias pós tratamento e observou-se que, independentemente de sua condição no início do tratamento, nenhum animal apresentou sinais clínicos da doença e que os títulos de anticorpos antileishmania estavam negativos ou mais baixos.

Okwor e Uzonna (2009) destacam que o uso de vacinas terapêuticas e outros imunobiológicos tem recebido grande atenção no tratamento da Leishmaniose. Essa estratégia, conhecida como imunoterapia, utiliza substâncias biológicas e/ou agentes imunobiológicos que atuam na modulação ou modificação da resposta imune, a fim de atingir um objetivo profilático e/ou terapêutico. Os agentes imunoterapêuticos podem exercer seu efeito por ação direta ou indireta, aumentando as defesas naturais e restaurando a função dos efetores desativados.

Toepp *et al.* (2018) realizaram um ensaio avaliando a eficácia da vacina como imunoterápico contra LVC, empregando a vacina comercial de proteína Leishmania A2 com saponina (LeishTec®) em cães de raça infectados com *L. infantum*. Verificou-se a redução da progressão clínica da doença com redução da mortalidade, sendo que a vacina como imunoterapia reduziu o risco de progressão para LVC evidente em 25% dos animais assintomáticos. Além disso, receber a vacina versus placebo reduziu a mortalidade por todas as causas em cães mais jovens assintomáticos em 70% (RR.:1,85-8,502 valor $p=0,0245$), constatado que o uso da vacinação em cães saudáveis infectados pode ser uma ferramenta para o controle da LVC.

Roatt *et al.* (2012) usaram 20 animais em sua pesquisa para comparar a resposta imunológica de cães vacinados só com o antígeno da *L. brasilienses*, comparando-os a outro grupo que recebeu o mesmo antígeno, porém com a saponina como adjuvante frente a um desafio com *L. infantum*, e saliva de *Lutzomia longipalpis*. Nesse estudo em que os cães que receberam a vacina com a saponina, grupo LBSap obtiveram um alto número de CD5 + Linfócitos T, bem como CD4 com subconjunto CD21, Células B e monócitos CD14. Além desse aumento, houve também um aumento da expressão IFN- γ em ambos os grupos e diminuição de citocinas regulatórias IL10 em cães do grupo com o adjuvante (LBSap), sugerindo que a vacina associada com a saponina promove a proteção contra a LVC mesmo após 885 dias de desafio. Como resultado, o grupo que utilizou a vacina com o adjuvante apresentou uma redução da carga parasitária em 54% e, aquele que utilizou somente a vacina, reduziu a carga parasitária em 40% em comparação a um grupo controle.

Uma nova estratégia de controle da LVC foi estudada por Cardoso *et al.* (2021) que investigaram o potencial do anticorpo monoclonal anti-receptor de IL10 para controlar e reduzir a infectividade *in vitro* de *L. infantum*. Além disso, desejou-se melhorar a capacidade de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) isoladas em cães LV para alternar a resposta linfoproliferativa e citocinas intracitoplasmáticas, reduzindo células CD4 + IL4 e aumentando células CD8 + INF γ . Após a estimulação de antígeno específico em PBMC, observou-se o aumento nos níveis de TNF- α no sobrenadante de PBMC, sugerindo que o bloqueio da atividade IL10 tem potencial para ser uma abordagem útil para o tratamento de LVC.

Todos os cães avaliados na presente pesquisa apresentavam, no início, sintomatologia clínica de Leishmaniose como onicogribose, dermatite esfoliativa pelo

corpo, em região periocular, ponte nasal e pavilhão auditivo bem como rarefação pilosa pelo corpo. Verificou-se que, após as 3 doses iniciais da vacina LaSap houve uma redução significativa dos sinais clínicos relacionados a LVC em todos os 9 cães estudados, os sintomas continuaram em remissão com os protocolos de ambos os grupos (grupo vacina e grupo vacina + alopurinol), nenhum dos cães apresentou aumento ou não teve a diminuição dos sintomas durante o experimento.

O mesmo resultado foi encontrado da pesquisa de Viana *et. al* (2018), onde 14 animais foram divididos em dois grupos: um grupo utilizando somente o antígeno da *L. amazonensis* e outro utilizando a o antígeno *L. amazonenses*, em associação com a saponina, neste estudo que é uma fase inicial de nossa pesquisa todos os animais estudados também apresentaram uma diminuição significativa da sintomatologia clínica durante a pesquisa.

A escolha da coleta para a contagem de parasitos em medula óssea ocorreu devido ao seu importante papel na imunopatogenia da infecção, além de apresentar um parasitismo significativo e a escolha do tecido cutâneo para a coleta é por ser considerado um potencial marcador da infectividade do cão para o flebotomíneo (MAIA *et al.*, 2009; CARSON *et al.*, 2010; BORJA *et al.*, 2016).

Os animais estudados do grupo vacina apresentaram uma diminuição plaquetária entre os tempos T0, T1 e T2, diferente dos animais dos grupos vacina + alopurinol que apresentaram um aumento da quantidade de plaquetas ente o tempo T0 e T1. Depois uma redução entre T1 e T2, ambos os grupos encerraram o estudo apresentando quadro de trombocitopenia, quadro que, segundo Feldman, Zinkl E Jain (2000), é comumente associada a Leishmaniose canina devido a uma vasculite por imunocomplexo direta ou secundária. Um estudo realizado por Nascimento *et al.* (2021) revelou a ocorrência de trombocitopenia em 70,9% dos animais estudados

Vale ressaltar que, como os cães são mantidos por ONG's de proteção animal e estão juntos com diversos outros animais, verificou-se durante o estudo a ocorrência de outras infecções, como a babesiose e erlichiose, que causam quadro semelhante como esse de trombocitopenia apresentado pelos animais. Tal quadro não foi observado no estudo de Roatt *et al.* (2012), onde os cães nascidos e criados em canil do Centro de Zootecnia da Universidade de Ouro Preto – MG e permaneceram em ambiente controlado durante todo o experimento.

Os monócitos se mantiveram dentro dos parâmetros normais durante todo o experimento. Os eosinófilos do grupo vacina se mantiveram abaixo do valor normal,

assim como os linfócitos que, segundo a pesquisa de Medeiros *et al.* (2008), ocorreu devido ao confinamento temporário dos linfócitos do baço e/ou linfonodos ou pela destruição linfocitária pela LVC. Nascimento *et al.* (2021), em seu estudo, também encontraram predominância de linfopenia e monocitose nos animais positivos para LVC. Neutrófilos e leucócitos não apresentaram alterações significativas durante a pesquisa, sendo que o mesmo ocorreu no estudo de Braz *et al.* (2015), onde a maioria dos animais apresentaram valores de leucócitos e neutrófilos dentro da normalidade.

Em relação aos exames bioquímicos, foi observado apenas uma hiperglobulinemia em um trabalho de Silva, Lima e Soto-Blanco (2011), sendo que esse aumento ocorreu em todos os cães positivos para a LVC, evidenciando a produção de anticorpos IgE, IgG, IgG1 e IgG2, resultando em uma resposta imune caracterizada como Th2.

A carga parasitária analisada pelo qPCR quantitativo sofreu uma grande redução do início ao final do tratamento, com maior expressão na carga parasitária de medula óssea, onde as reduções da quantidade de parasitos entre T0 e T2 chegou a 80% com mínima de 45%. Na pesquisa, foi possível observar que não ocorreram diferenças estatísticas significantes de redução de carga parasitária entre os dois grupos. No trabalho de Viana *et al.* (2018), onde utilizou-se a mesma vacina empregada no presente estudo, ocorreu uma redução significativa da carga parasitária, especialmente em cães tratados com LaSap ($P < 0,05$) em T90 ($313,1 \pm 718,5$) e T180 ($348,9 \pm 735,5$), em comparação com T0 (10.470 ± 10.270).

A carga parasitária inicial (T0) em todos os animais estudados foi maior em medula óssea do que em pele, o que contraria o estudo realizado por Chagas *et al.* (1937/2009), onde apresentou carga parasitária maior quando comparado às amostras provenientes de *swab* conjuntival e aspirados de linfonodo poplíteo e medula óssea em três diferentes cenários avaliados, sendo considerado o tecido de eleição para o monitoramento de cães naturalmente infectados por *L. infantum* com diferentes status clínicos. Reis *et al.* (2009) correlacionaram altos índices de parasitismos com animais sintomáticos e animais assintomáticos com baixos níveis de parasitismo. Em seu estudo, foi correlacionado o tecido parasitado com as formas clínicas de LVC e, de acordo com os resultados, independentemente do estado clínico, a pele e o baço são os locais mais parasitados durante a doença em curso. Contudo, a densidade do parasita na medula e no baço são os locais mais confiáveis para marcar o estado clínico da LVC.

A redução da carga parasitária na pele também foi observada em todos os animais de ambos os grupos. Nas duas amostras analisadas em T2, foi observado no grupo 1 (onde os animais foram tratados apenas com a vacina sem a associação com o alopurinol) uma redução da carga parasitária na pele, menor em dois dos cinco animais estudados, em comparação com uma baixa redução em apenas um animal dos quatro estudados.

8 CONCLUSÃO

Os dois grupos testados apresentaram uma excelente resposta frente à sintomatologia de LVC, com acentuada redução das lesões de pele atribuídas a LVC e melhora no aspecto clínico dos mesmos. Não ocorreram mudanças no perfil hematológico dos animais e ocorreu uma grande diminuição de carga parasitária tanto em pele, quanto em medula, não ocorrendo diferenças significativas entre os grupos. Isto pode indicar que, somente com o uso da imunoterapia LaSap, é possível manter o paciente canino controlado clinicamente, não necessitando do Alopurinol para manter a carga parasitária reduzida. No entanto, como mostrado em estudo anterior, há necessidade de doses de reforço para manutenção do quadro. Não foi observado em nenhum dos animais sinais de reação adversa a imunoterapia com a LaSap, não sendo observado sintomas como edema, dor ou hipertermia no local da aplicação.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Paulo Fernando; RODRIGUES, Rodrigues. Leishmaniose Visceral no Brasil: artigo de revisão. **Rev. UNIMONTES Científica**. Montes Claros, v. 19, n.1. 2017. Disponível em: <<http://www.ruc.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/526>>. Acesso em: 11 jul. 2020.
- ALVAR, Jorge *et al.* Canine Leishmaniasis. **Adv. Parasitol.** 57, 1-87, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15504537/>>. Acesso em: 16 ago. 2020.
- ALVAR, Jorge *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLOS ONE** 7(5): e35671. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>>. Acesso em: 18 ago. 2019.
- ARAÚJO, Camila de Melo Costa; COSTA, Alisson de Souza. **Uso da Miltefosina como terapia combinada em Leishmaniose Visceral Canina – Relato de caso**. 2018. 11f. Trabalho de Conclusão de Residência Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – 2018.
- AZEVEDO, Jaqueline dos Santos. **Estudo retrospectivo de casos de Leishmaniose visceral canina atendidos em um hospital veterinário de uma área endêmica para a doença**. 2019. 70f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Araçatuba, 2019.
- BANETH, Gad *et al.* Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.** 24(7):324-30. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18514028/>>. Acesso em: 16 set. 2020.
- BLANCO, Vinícius R.; NASCIMENTO-JUNIOR, Nailton. M. *Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas*. **Rev. Virtual Quim.** V. 9, No. 3, P. 861-876, 2017. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=762>. Acesso em: 06 jul. 2020.
- BOELAERT, M. *et al.* The poorest of the poor: a poverty appraisal of households affected by visceral Leishmaniasis in Bihar, India. **Trop Med Int Health.** v.14, p.639–644, 2009.
- BORJA, Lairton Souza *et al.* Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Veterinary Parasitology**, 229, 110-117, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19392741/>>. Acesso em: 24 nov. 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Letalidade de Leishmaniose visceral**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2000 a 2009 <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/4_lv_letalidade_14_10_10.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2019.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **MAPA – Leishmaniose Visceral**. 2016. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/26/Modelo-Apresentacao-SVS-2018-periodo-eleitoral-CGDT.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Tocantins** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 34 p. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).

BRAZ, Paulo Henrique *et al.* Perfil Hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* **Acta Veterinária Brasilica**, 9(1), 87-90. 2015. Disponível em: <<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/5273>>. Acesso em: 09 jul. 2021.

CARDOSO, Jamille Mirelle de Oliveira *et al.* IL-10 receptor blockade controls the in vitro infectivity of *Leishmania infantum* and promotes a Th1 activation in PBMC of dogs with visceral leishmaniasis. **Mol Immunol**. 137: 20-27. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34182228/>>. Acesso em: 11 ago. 2020.

CARDOSO, Jamille Mirelle de Oliveira. **Tratamento da Leishmaniose visceral canina empregando duas abordagens terapêuticas distintas: quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal e imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10**. 2018. 146f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto – 2018).

CARSON, Connor *et al.* Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of canine IgG1 and IgG2, and associations with infection outcome in *Leishmania infantum* naturally infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 133(2-4): 264-268, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19726090/>>. Acesso em: 03 nov. 2020.

CHAGAS, E. *et al.* Leishmaniose Visceral Americana (Nova entidade mórbida do homem na América do Sul): relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 32, 1937. Publicação nesta coleção – 2009.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral Leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev. Microbiol**. v.5, p.873–882, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17938629/>>. Acesso em: 17 jun. 2020.

CORTEGIANO, Bruna Martinelli; CHUCRI, Thais Martins. Prevalência da Leishmaniose Visceral Canina no Hovet Unimes em Santos-SP. **Braz. J. of Develop.**

Curitiba, v. 6, n. 7, p. 48594-48602. 2020. Disponível em: < <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/13516>>. Acesso em: 01 jul. 2021.

COSTA, Danielle Nunes Carneiro Castro. **Leishmaniose Visceral Canina nos municípios de Araçatuba e Birigui, estado de São Paulo, Brasil**. 2018. 130f. Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo – 2018.

CROFT, Simon L.; SUNDAR, Shyam; FAIRLAMB, Alan H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev.** 19(1): 111–26. 2006. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16418526/>>. Acesso em: 22 mai. 2021.

FARIA, Angélica Rosa *et al.* Novel recombinant multiepitope proteins for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania infantum*-infected dogs. **PLoS Negl Trop Dis.** 2015; 9(1): e3429. 2015. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003429>>. Acesso em: 12 ago. 2020.

FARIA, Angélica Rosa; ANDRADE, Héliida Monteiro de. Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral Canina: grandes avances tecnológicos y baja aplicación práctica. **Rev Pan-Amaz Saude.** 2012, vol.3, n.2, pp.47-57. Disponível em: <<http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v3n2/v3n2a07.pdf>>. Acesso em: 08 set. 2020.

FELDMAN, B.V.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Canada: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 1344p. Disponível em: < [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjt55.\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2015674](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjt55.))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2015674)>. Acesso em: 13 dez. 2020.

FONTES, Stella Diogo; SILVA, Alessandra Sayegh Arreguy. Leishmaniose Visceral Canina: revisão de literatura. **Rev da Universidade do Vale do Rio Verde.** Vol.16, n.1. 2011. Disponível em: < <https://academico.univicoso.com.br/revista/index.php/RevistaSimpac/article/view/368>>. Acesso em: 01 ago. 2020.

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol.** 30;137(3-4):214-21. 2006. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16473467/>>. Acesso em: 21 mar. 2021.

GAUTAM, S. *et al.* IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral Leishmaniasis. **J Infect Dis.** 204:1134-7, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3164427/>>. Acesso em> 30 mar. 2021.

GÓMEZ-OCHOA, P. *et al.* Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **The Vet J.** 179(2): 259-63. 2009. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18023375/>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

JERICÓ, Márcia Marques; ANDRADE NETO, João Pedro de; KOGIKA, Márcia Mery. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. [S.l: s.n.], 2015.

LIMA JUNIOR, Francisco Edilson Ferreira de. *Leishmaniose: vacina, tratamento ou sacrifício animal como estratégia de saúde única?* 2017. In: **ENDESA – Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal**. Belém/PA – 04 a 08 de dezembro de 2017.

LISBOA J. C. L. *et al.* Acompanhamento clínico e laboratorial de cães parasitologicamente positivos para leishmaniose visceral submetidos à terapia com miltefosina associada ao alopurinol. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 16, n. 3, p. 79-80, 2018. Disponível em: <<https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/37829>>. Acesso em: 11 set. 2020.

LUKES, Julius *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci, U S A**, v.104, p.9375–9380, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17517634/>>. Acesso em: 13 jul. 2020.

MAIA, Carla *et al.* Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **Veterinary Journal**, 179, 142–144, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17936654/>>. Acesso em: 12 out. 2020.

MAIA-ELKHOURY, Ana Nilce Silveira *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 24(12):2941-2947, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/csp/a/Mx3qwXBr6YRLjHjn7NcP9RD/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 09 jul. 2020.

MANNA, Laura *et al.* Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res Vet Sci**. 87(1):76-8. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19178919/>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

MEDEIROS, Christiane Myrta de Oliveira *et al.* Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, 18(1): 43-50, 2008. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-4599>>. Acesso em: 12 nov. 2020.

MEGID, Jane. **Doenças Infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. Ed. – [reimp.] – Rio de Janeiro: Roca, 2016. 1294p.

MOLINA, R. *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 88(4):491-3. 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7570854/>>. Acesso em: 30 mai. 2021.

MUSA, A.M. *et al.* Immunological stimulation for the treatment of *Leishmaniasis*: a modality worthy of serious consideration. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 104: 1-2, 2010 Review. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19712953/>>. Acesso em: 12 fev. 2021.

NASCIMENTO, Jéssica Peçanha *et al.* Alterações hematológicas em cães positivos para *Leishmania* spp em esfregaço sanguíneo. **PUBVET**. v.15, n.03, a776, p.1-5, 2021. Disponível em: <<https://www.pubvet.com.br/artigo/7611/alteraccedilolildees-hematoloacutegicas-em-catildees-positivos-para-leishmania-spp-em-esfregaccedilo-sanguiacuteneo>>. Acesso em: 02 mar. 2021.

NASCIMENTO, Leopoldo Fabrício Marçal do *et al.* Novos adjuvantes vacinais: importante ferramenta para imunoterapia da leishmaniose visceral. **HU rev**; 44(3): 401-410, 2018. Disponível em: <<https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/14123>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

OKWOR, Ifeoma; UZONNA Jude E. Immunotherapy as a strategy for treatment of leishmaniasis: a review of the literature. **Immunotherapy**. 1(5):765–76. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20636022/>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE – OPAS. **Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas**. 6. ed. Brasília: OMS; 2018. Disponível em: <<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?seq>>. Acesso em: 08 abr. 2021.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. *et al.* Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral Leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65(5): 510-517. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11716106/>>. Acesso em: 31 jan. 2021.

PROVÉRPIO, Daniela *et al.* Failure of Miltefosine treatment in two dogs with natural *Leishmania infantum* Infection. **Case Reports in Veterinary Medicine**, vol. 2014, Article ID 640151, 6 pages, 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/crivem/2014/640151/>>. Acesso em: 02 set. 2020.

REGUERA, Rosa M. *et al.* Current status on prevention and treatment of canine *Leishmaniasis*. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, n. 227, p. 98–114, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27523945/>>. Acesso em: 26 jun. 2020.

REIS, Alexandre Barbosa *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**. 128: 87–95. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19054576/>>. Acesso em: 09 ago. 2020.

RENZETTI, Alinne Rangel dos Santos. **Avaliação da resposta imune induzida pela Nucleosídeo Hidrolase (NH36) de *Leishmania (L.) donovani* em cães imunizados com a vacina Leishmune®**. Rio de Janeiro, 2017. 88f. Dissertação de Mestrado (Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas). Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Rio de Janeiro – 2017.

ROATT, Bruno Mendes *et al.* Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and

Parasitological Evaluation. **PLOS ONE**. 7(11): e49780. 2012. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049780>>. Acesso em: 03 jul. 2021.

ROATT, Bruno Mendes. **Avaliação de uma vacina terapêutica (LBMPL) no tratamento da Leishmaniose Visceral utilizando o cão naturalmente infectado com *Leishmania Infantum* como modelo experimental**. 2013. 170f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto/MG – 2013.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, Alheli *et al.* A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**. 37: 683–693. 2007. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17239885/>>. Acesso em: 06 nov. 2020.

ROLIM, Fernanda *et al.* Leishmaniose Visceral Canina: detecção de DNA em soro por PCR em tempo real. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**. Canoas, n.14, p.36-46, 2016. Disponível em: < <https://www.semanticscholar.org/paper/>>. Acesso em: 07 jun. 2021.

SALOMON, Oscar D *et al.* Visceral leishmaniasis in border areas: clustered distribution of phlebotomine sand flies in Clorinda, Argentina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n.5, p.801-804, 2009. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/mioc/a/5HhdsqVYXgnWpbx9CSCdKts/?lang=en>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

SALOMON, Oscar D; ORELLANO, Pablo W. *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.5, p.475-476, 2005. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/mioc/a/4Dx8xDzxmFgVBbyJhTvLjLD/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

SANTOS, Renato de Lima; ALESSI, Antônio Carlos. **Patologia Veterinária**. São Paulo – Roca, 2010.

SCHIMMING, Bruno Cesar; PINTO E SILVA, José Ricardo Carvalho. Leishmaniose Visceral Canina – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano X – Número 19 – julho de 2012 – Periódicos Semestral. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/140317>>. Acesso em: 16 ago. 2020.

SILVA, Alexandre Disraelly Fernandes da; LIMA, Maíra Conceição Jeronimo de Souza; SOTO-BLANCO, Benito. Perfil hematológico e eletroforético de proteínas séricas em cães soropositivos para leishmaniose visceral no estado do Rio Grande do Norte. **Acta Veterinaria Brasilica**. v.5, n.3, p.300-305. 2011. Disponível em: < <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/2551>>. Acesso em: 12 mai. 2020.

SILVA, Lays Adrienne Mendonça Trajano. **Caracterização da resposta imune celular em cães frente a novos antígenos de *Leishmania infantum***. 2017. 85f. Dissertação de Mestrado (Biociências e Biotecnologia em Saúde). Instituto Aggeu

Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife – 2017.

SILVA, Raizza B.S. *et al.* Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesq. Vet. Bras.** 2016, vol.36, n.7, pp.625-629. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/jgKmMn6T5YfKDLXswwvpRJg/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2020.

SOARES-BEZERRA, Rômulo José; LEON, Leonor; GENESTRA, Marcelo. Recentes avanços da quimioterapia das *Leishmanioses*: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** 2004. vol.40, n.2, pp.139-149. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbcf/a/WtdHYPZ8pcQfX5CRtC4XwPw/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 07 set. 2020.

SOUZA E SILVA, Cláudia Marina Hachmann de; WINK, César Augustus. Leishmaniose Visceral Canina: revisão de literatura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde.** v.16, n.1, 2018. Disponível em: <<http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/3383/0>>. Acesso em: 18 mar. 2021.

TEIXEIRA, Ana Izabel Passarella. **Cães e tutores: os desafios do diagnóstico e do controle da Leishmaniose visceral canina.** 2019. 178f. Tese de Doutorado (Medicina Tropical). Universidade de Brasília – UNB. Brasília, 2019.

TOEPP, Angela *et al.* Randomized, controlled, double-blinded field trial to assess Leishmania vaccine effectiveness as immunotherapy for canine leishmaniosis. **Vaccine.** 36(43): 6433-6441. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30219369/>>. Acesso em: 01 ago. 2020.

TOLEZANO, José E. *et al.* The first records of Leishmania (*Leishmania*) amazonensis in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Aracatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology.** 149: 280–284. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17720321/>>. Acesso em: 29 mar. 2021.

TRAVI, Bruno L.; MIRÓ, Guadalupe. Use of domperidone in canine visceral leishmaniasis: gaps in veterinary knowledge and epidemiological implications. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 18;113(11): e180301. 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/mioc/a/mdBvKQNJLT8QrJWsCXZMQ7z/?lang=en>>. Acesso em: 06 ago. 2020.

VIANA, Kelvinson Fernandes Viana *et al.* Therapeutic vaccine of killed *Leishmania amazonensis* plus saponin reduced parasite burden in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology** 254; 98–104. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29657019/>>. Acesso em: 04 mar. 2020.

VITES J.P; MORALES L.R.S. Tratamento da Leishmaniose visceral canina com miltefosina – relato de casos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, V16, n3, p.80, 11.dez. 2018.

VITO, Murillo de. **Aspectos gerais da Leishmaniose visceral**. 2019. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). FAEMA – Faculdade de Educação e Meio Ambiente. Ariquemes/RO – 2019.

YASUR-LANDAU, Daniel; JAFFE, Charles L.; DAVID, Lior; BANETH Gad. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. **PLoS Negl Trop Dis.** 10(1): e0004341. 2016. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004341>>. Acesso em: 13 set. 2020.

ANEXOS**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UNILA**

O projeto intitulado “Bioprospecção de Imunobiológicos Destinados à Saúde Animal e Humana”, processo de número 001/2018, sob responsabilidade do professor Kelvinson Fernandes Viana, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), sendo portanto aprovado pela CEUA desta universidade, em reunião realizada em 19 de abril do corrente ano.

Foz do Iguaçu, 21 de abril de 2019.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Flávio Luiz Tavares', is positioned above the printed name.

Prof. Dr. Flávio Luiz Tavares
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais - UNILA