



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS -
PPGVET

MARIA SABRINA DE FREITAS

**Avaliação clínico-patológica cutânea de cães com leishmaniose visceral
tratados com miltefosina e alopurinol**

Cuiabá
2024

Maria Sabrina de Freitas

**Avaliação clínico-patológica cutânea de cães com leishmaniose visceral
tratados com miltefosina e alopurinol**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGVET) da Universidade Federal de Mato Grosso, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, área de concentração: Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Valéria Régia Franco Sousa

Cuiabá
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

D278a de Freitas, Maria Sabrina.

Avaliação clínico-patológica cutânea de cães com leishmaniose visceral tratados com miltefosina e alopurinol [recurso eletrônico] / Maria Sabrina de Freitas. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 103 f., il. color., pdf). -- 2024.

Orientadora: Valéria Régia Franco Sousa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2024.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

1. Dermatopatias. 2. Macrófago. 3. Exame histopatológico. 4. Escore clínico. 5. qPCR. I. Sousa, Valéria Régia Franco, *orientador*. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA CUTÂNEA DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL TRATADOS COM MILTEFOSINA E ALOPURINOL

AUTORA: Mestranda Maria Sabrina de Freitas

Dissertação defendida e aprovada em 29 de fevereiro de 2024.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Doutora Valéria Régia Franco Sousa (Presidente banca/Orientadora)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutora Mahyumi Fujimori (Examinadora Externa)

Instituição: Instituto Butantan

Doutora Naiani Domingos Gasparetto Veggi (Examinadora Interna)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutora Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida (Examinadora Suplente)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Cuiabá, 29 de fevereiro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Mahyumi Fujimori, Usuário Externo**, em 29/02/2024, às 20:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **VALERIA REGIA FRANCO SOUSA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 04/03/2024, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **NAIANI DOMINGOS GASPARETTO, Técnico Administrativo em Educação do HOVET - Secretaria / FAVET - UFMT**, em 04/03/2024, às 11:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6663191** e o código CRC **7DFEDED**.

Agradecimentos

A Deus e São Francisco de Assis.

A minha família, em especial meus pais Mário Roberto de Freitas e Maria José Feliciano de Freitas, por todo amor, carinho, cuidado e exemplo. Ao meu irmão, José Luiz de Freitas pelo apoio, amor e companheirismo. A minha avó, Maria Gonçalves de Freitas por tanto amor e carinho. A Florinda, Chico Bento, Valentim, Cookie, Hortência, Natalina e Clarinha (em memória) por encher minha vida de amor e alegria. Vocês são meu sustento. Amo vocês.

A minha irmã, Maria Natália de Freitas: que é a minha companheira, melhor amiga e autora junto comigo desse trabalho! É também meu exemplo de integridade e a melhor Médica Veterinária desse mundo. Eu te amo. Esse trabalho é nosso!

Aos meus queridos pacientes: Minie, Baby, Snow, Bob, Mila, Milla, Bionda, Fred, Pepita, Fred Caramelo, Belinha, Cake, Cherry, Tob, Bob, Pipoca Filho, Aioa, Diana, Buda, Apollo, Bob, Apolo, Pantera, Teca, Bob, Mac, Apolo, Enzo, Harry Potter, Amora, Peko, Neguinha, Safira, Zeus, Princesa, Aurora, Athena, Foquinha, Bela, Mel, Felipe, Lula, Bento, Chocolate, Dila e Pantera. Em especial: Mel, Puk, Lexie, Thor, Shitara e Astor que já não estão mais aqui, meu respeito, amor e carinho. Vocês ensinam todos os dias que todo esforço vale a pena. E ainda que não exista a cura, proporcionar qualidade de vida é o meu maior presente.

A minha orientadora, Profa. Dra. Valéria Régia Franco Sousa, que tenho como exemplo de ética e profissionalismo desde a graduação. Agradeço imensamente pela orientação, ensinamentos, dedicação, amizade e oportunidade.

A médica Veterinária Dra. Naiani Domingos Gasparetto Veggi, agradeço imensamente pela amizade, pelo carinho, pelas risadas e inúmeros momentos felizes, por todo auxílio no decorrer do mestrado nas análises histopatológicas e imuno-histoquímica. Sou muito grata por poder conviver com você que sempre foi um exemplo!

A Prof. Dra Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida que também é exemplo de profissionalismo. Agradeço imensamente pelos ensinamentos e pelo auxílio nos ensaios qPCR e por todo auxílio no decorrer do mestrado.

Aos meus amigos, alguns companheiros desde residência, outros desde o mestrado: Juliana Carvelo, Thaiza Fernanda, João Paulo Campos Ribeiro, Edison Lorrán, Helloine Antunes, Jaqueline Konrad, Tayane Magalhães, Arlyson Sousa, Fábio Dumit, Matheus Anthony Mendes, Hanna Rodrigues e Alejandra Núñez. Pessoas incríveis com quem eu tenho o privilégio de conviver diariamente. Muito obrigada por tudo!

A equipe Clínica Médica: técnicas de enfermagem, Jaqueline Konrad, Edna Conceição, Regina Silva Almeida e Jurema Rodrigues por toda ajuda, por tanto carinho e pela amizade. Residentes, Anna Carolina Pecini, Amanda Balata, Vanessa Moura, Anna Júlia Paes de Barros, Bianca Ribas, Ana Carolina Schipiura e Esthéfanie Nunes pela amizade e por toda ajuda. As farmacêuticas, Marillin Castro e Juliane Porto por toda ajuda, pelas risadas e momentos de alegrias na janela da farmácia. A equipe HOVET-UFMT: Hélida Santos, Greice Mazzer e Lenilson Amaral por sempre me ajudarem de forma solícita e com muito carinho.

Aos estagiários da Clínica Médica, bolsistas e voluntários de iniciação científica do Laboratório de Leishmanioses (HOVET-UFMT): Natanny Santos, Raul Dias, Maria Gabriela de Mendonça, Gabriel Lucas Artiaga, Yasmin Pedroso pelo auxílio nas coletas.

Ao Prof. Dr. Luciano Nakazato e aos residentes, mestrandos e doutorandos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular por toda ajuda no desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Edson Moleta Colodel e aos residentes, mestrandos e doutorandos e técnicos do Laboratório de Patologia por toda ajuda no desenvolvimento do projeto. Um agradecimento especial para Adriele Queiroz que sempre me auxiliou no processamento das amostras com quem eu partilhei momentos felizes e aprendi muito!!

A Profa. Dra. Adriane Jorge Mendonça. As técnicas do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária: Maria do Carmo Aragão e Laura Cristina Araújo sempre solícitas. As residentes: Sarah Pazzini, Bruna Adona, Ingrid Rondon e Fábiana Magalhães. Agradeço a todas pela parceria no desenvolvimento do projeto e por toda ajuda ao longo desses anos. Muito obrigada!

Ao Prof. Pedro Néspoli e as residentes do Setor Diagnóstico por Imagem Jéssica Lopes, Ana Flávia Borges e Cristiane Trevisan por toda ajuda e carinho dedicado a todos os pacientes desse estudo.

Ao prof. Dr. Juliano Bortolini pela análise estatística.

Aos tutores dos cães acompanhados ao longo desses dois anos por terem aceitado participar deste estudo e pela confiança depositada em nossa equipe para o tratamento de seus cães.

Esse trabalho é fruto de uma ação coletiva e não seria possível sem a ajuda de cada um. Meu muito obrigada a todos e todas!!!!

Resumo

A leishmaniose visceral é uma zoonose com milhares de novos casos anualmente em todo o mundo. Em alguns países, dentre eles o Brasil, se configura como um sério agravo à saúde pública. O cão, o principal reservatório, mantém a endemicidade da LV no meio urbano devido à sua proximidade com o homem e à alta carga parasitária cutânea. A pele tem uma importante participação na imunopatogenia da doença, pois é o primeiro órgão infectado pelo parasito, além disso, pelo aspecto dermatrópico da *L. infantum* há elevada carga parasitária facilitando a infectividade ao vetor. Diante do exposto, este estudo teve por objetivo avaliar os achados clínicos, histopatológicos e a carga parasitária da pele dos cães com leishmaniose visceral tratados com miltefosina associado ao alopurinol. Dezesete cães foram avaliados antes e após 150 dias do início do tratamento, submetidos a coletas de amostras de pele, sangue e urina para estabelecer o escore clínico e descrever os achados clínicos dermatológicos e aspectos histopatológicos, além de quantificar a carga parasitária da pele por qPCR. Após o tratamento se observou redução do escore clínico e das anormalidades laboratoriais, com remissão de alguns sinais clínicos e normalidade dos valores médios de hemoglobina, hematócrito e a relação albumina/globulina. As principais alterações cutâneas inicialmente observadas foram alopecia/hipotricose, dermatite ulcerativa, dermatite esfoliativa e hiperqueratose nasodigital. Após o tratamento houve redução das lesões macroscópicas e diminuição da inflamação, com predomínio de macrófagos no infiltrado inflamatório, além disso, houve redução significativa da carga parasitária em todos os cães. A miltefosina em associação com alopurinol promoveu a melhora clínica, a diminuição do escore clínico, a redução na carga parasitária e melhora da inflamação cutânea de cães em 150 dias de tratamento.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; dermatopatias; escore clínico; exame histopatológico; macrófago; qPCR

Abstract

Visceral leishmaniasis is a zoonosis with thousands of new cases annually worldwide. In some countries, including Brazil, it is a serious public health problem. The dog, the main reservoir, maintains the endemicity of VL in the urban environment due to its proximity to humans and the high cutaneous parasite load. The skin plays an important role in the immunopathogenesis of the disease, as it is the first organ infected by the parasite, in addition, due to the dermatotropic aspect of *L. infantum*, there is a high parasite load, facilitating infectivity to the vector. In view of the above, this study aimed to evaluate the clinical and histopathological findings and the parasite load of the skin of dogs with visceral leishmaniasis treated with miltefosine associated with allopurinol. Seventeen dogs were evaluated before and after 150 days of the beginning of treatment, submitted to collection of skin, blood and urine samples to establish the clinical score and describe the dermatological clinical findings and histopathological aspects, in addition to quantifying the skin parasite load by qPCR. After treatment, a reduction in the clinical score and laboratory abnormalities was observed, with remission of some clinical signs and normality of the mean values of hemoglobin, hematocrit and albumin/globulin ratio. The main skin changes initially observed were alopecia/hypotrichosis, ulcerative dermatitis, exfoliative dermatitis, and nasodigital hyperkeratosis. After treatment, there was a reduction in macroscopic lesions and a decrease in inflammation, with a predominance of macrophages in the inflammatory infiltrate, in addition, there was a significant reduction in the parasite load in all dogs. Miltefosine in association with allopurinol promoted clinical improvement, decreased clinical score, reduced parasite load, and improved skin inflammation in dogs after 150 days of treatment.

Keywords: *Leishmania infantum*; skin diseases; clinical score; histopathological examination; macrophage; qPCR

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Histórico	13
2.2 Agente Etiológico e Taxonomia	15
2.3 Transmissão e ciclo biológico	16
2.4 Epidemiologia	18
2.5 Patogenia e características clínicas da LVC.....	19
2.6 A pele e a LVC	22
2.7 Estadiamento clínico na LVC.....	28
2.8 Achados laboratoriais	34
2.9 Diagnóstico	35
2.9.1 Diagnóstico parasitológico	36
2.9.2 Diagnóstico sorológico	37
2.9.3 Diagnóstico molecular	38
2.10 Tratamento e Prognóstico	40
2.11 Prevenção	46
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 Procedimento Ético	49
3.2 Desenho do estudo	49
3.3 Avaliação clínica.....	50
3.4 Análise hematológica, bioquímica e urinária	53
3.5 Biópsia e Histopatologia de pele	53
3.6 Extração de DNA e qPCR	55
3.7 Análises estatísticas	56
4 RESULTADOS	57
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICE A – Tabela alterações dermatológicas, carga parasitária e exame histopatológico dos cães com leishmaniose visceral em D0 e D150	83
APÊNDICE B – Ficha exame histopatológico pele	85

APÊNDICE C – Clinicopathologic findings and parasite load on the skin of dogs with visceral leishmaniasis treated with miltefosine and allopurinol	87
APÊNDICE D – Qualis da revista.....	102
APÊNDICE E – Comprovante submissão artigo	103

1 Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença complexa e se caracteriza como uma das principais doenças parasitárias negligenciadas no mundo (PFARR et al., 2023), afetando principalmente populações em vulnerabilidade econômica nos países em desenvolvimento sendo uma importante zoonose se configurando como sério agravo à saúde pública em muitos países, dentre eles o Brasil (BRASIL, 2018; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; PROVERBIO et al., 2014b; WHO, 2023).

O Brasil está entre os países com maior número de casos de LV e na América Latina responde por 95,1% das notificações (MARCONDES; DAY, 2019). Esta doença possui caráter crônico e fatal se não tratada (BRASILEISH, 2018; BRASIL, 2018; CHAGAS et al., 2021; LEITE et al., 2018; WHO, 2023). É causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (syn.: *L. chagasi*) e a transmissão ocorre pela picada de fêmeas flebotomíneas infectadas (*Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*). O cão, devido ao importante parasitismo cutâneo e à proximidade com o homem, atua na manutenção da doença mantendo a endemicidade da LV no meio urbano (ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010; CHAGAS et al., 2021; MARTÍNEZ et al., 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2009) e é um dos principais responsáveis pela disseminação da doença precedendo casos de LV em humanos (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022).

Nos cães, a variedade de sinais clínicos e de lesões estão diretamente relacionados à resposta imunológica, ao tempo de evolução da doença e a carga parasitária (CASTRO et al., 2012; GONÇALVES et al., 2019). Os cães podem ser assintomáticos ou severamente doentes (ROSÁRIO et al., 2019) de acordo com a intensidade da resposta anti-inflamatória ou pró-inflamatória, bem como a resposta ao tratamento (FREITAS et al., 2016). Os sinais clínicos incluem hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, hipertermia, apatia, caquexia, oftalmopatia, epistaxe e diarreia (ANDRADE et al., 2018), além dos sinais dermatológicos.

A pele exerce um importante papel na imunopatogenia da doença (PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015), pois é o primeiro órgão infectado pelo parasito, além disso, pelo aspecto dermatrópico da *L. infantum* há elevada carga parasitária facilitando a infectividade ao vetor (ARUMUNGAM et al., 2022).

Os sinais dermatológicos são as manifestações mais comuns e se caracterizam por diferentes padrões de lesões (ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2011), tais como seborreia seca, dermatite esfoliativa, úlceras, nódulos e/ou pápulas (PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015). No exame histopatológico, se observa infiltrado inflamatório de macrófagos com citoplasma repleto de amastigotas ou não, além de plasmócitos, linfócitos e neutrófilos na derme (JACINTHO, 2012), mas o predomínio de células no infiltrado inflamatório pode variar de acordo com a carga parasitária (VERÇOSA et al., 2008).

A eutanásia ainda é a medida de controle preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2006). No entanto, é controversa e alvo de críticas por parte da comunidade científica uma vez que alguns estudos não mostram diminuição da incidência da infecção em cães ou em humanos (DANTAS-TORRES et al., 2019b). Diante disso e da aprovação do uso da miltefosina para o tratamento de cães com LV em 2016 pelo Ministério da Agricultura e Pecuária, tem sido então apontado como uma alternativa. A miltefosina é um fármaco com atividade leishmanicida, pois inibe o crescimento das formas promastigotas e causa a morte das formas amastigotas (VIDES et al., 2018), sendo o único medicamento autorizado para tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) no Brasil. No continente europeu outras drogas podem ser prescritas para o tratamento dos cães, dentre elas, o antimoniato de meglumina e o alopurinol (MANNA et al., 2015). O alopurinol tem atividade leishmanioestática, é um análogo da hipoxantina que age interferindo na síntese proteica do parasito (ARTACHO, 2009 e GONÇALVES et al., 2019). Estudos demonstraram melhora no escore clínico-patológico e redução da infectividade em cães com LVC tratados com miltefosina isolada ou em associação ao alopurinol (DIAS et al., 2020; NOGUEIRA et al., 2019). Apesar, de haver estudo que demonstra a diminuição da carga parasitária na pele a curto prazo com este protocolo (AYRES et al., 2022), ainda existe uma lacuna sobre as alterações macro e microscópicas da pele dos cães sob tratamento.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os achados clínicos, histopatológicos cutâneos e a carga parasitária da pele dos cães com leishmaniose visceral tratados com miltefosina em associação com alopurinol acompanhados durante 150 dias.

2 Revisão de literatura

2.1 Histórico

Os primeiros casos de LV foram descritos na Índia em novembro de 1900, quando o patologista escocês William Boog Leishman observou estruturas ovoides em esfregaços de baço de um soldado que viera a óbito apresentando esplenomegalia na cidade de Dum Dum. Mais tarde, Boog Leishman visualizou novamente os mesmos corpos ovoides em ratos após infecção experimental. Publicou a descoberta em 1903, denominando-a de “febre Dum-Dum”, sugerindo ser causada por formas degeneradas de *Trypanosoma*. Posteriormente o médico irlandês Charles Donovan, professor de fisiologia, publicou um artigo relatando a observação de corpos semelhantes em amostras de baço de indianos que morreram após apresentar febre intermitente e esplenomegalia. Duvidando de que as estruturas fossem uma espécie de *Trypanosoma*, Donovan encaminhou uma lâmina para biólogo francês Félix Étienne Pierre Mesnil em Paris, e pediu para que ele mostrasse a Charles Louis Alphonse Laveran – autoridade em parasitologia. Após análise, Laveran pensou se tratar de um novo parasito do gênero *Piroplasma* (STEVRDING, 2017).

Na mesma época, em 1898, o médico britânico Ronald Ross investigava a doença calazar e publicou também um artigo em 1903 comentando a descoberta dos corpos ovoides encontrados por Leishman e Donovan em baço de pacientes com febre crônica e esplenomegalia, concluindo que essas estruturas não eram formas degeneradas de *Trypanosoma*, mas sim um novo protozoário cujo quadro clínico se assemelhava ao calazar. Ross também refutou a ideia de Laveran de que os corpos ovoides eram parasitos do gênero *Piroplasma*, mas que pertenciam a um novo gênero que ele propôs chamar *Leishmania donovani*, a discussão sobre o assunto postergou por mais um ano, quando em 1904 o termo *Leishmania donovani* foi adotado (STEVRDING, 2017).

No entanto a espécie causadora da LV relacionada a *L. infantum* foi descrita pela primeira vez em 1908 pelo bacteriologista francês Charles Jules Henry Nicolle na Tunísia em crianças com quadro de anemia e esplenomegalia. No mesmo ano, Nicolle junto com Charles Comte incriminaram a participação

dos cães no ciclo biológico da doença, após a observação do agente etiológico nos animais (STEVERDING, 2017).

Evidências sugerem que a introdução de *L. infantum* nas Américas ocorreu há 500 anos pelos colonos europeus e seus cães (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022; STEVERDING, 2017). Mas provavelmente o primeiro relato no continente de LV foi realizado por Migone em 1913 em um paciente no Paraguai que havia trabalhado na construção da ferrovia São Paulo-Corumbá, no Brasil (BRASIL, 2006; LAINSON, 2010). No Brasil, apenas em 1934 foi considerada um problema de saúde pública, após análises histopatológicas post-mortem de 41 fragmentos de fígado de indivíduos oriundos das Regiões Norte e Nordeste, negativos para febre amarela, onde foram identificados protozoários do gênero *Leishmania* (BENCHIMOL et al., 2019). Em 1937, Cunha e Chagas denominaram o parasito extraído de casos de LV no Brasil, *Leishmania chagasi*. Em 1968, a raposa *Cerdocyon thous* foi incriminada como um importante reservatório de *L. chagasi*. Ainda neste período o pesquisador Evandro Chagas fez uma das primeiras observações da infecção em cães por *Leishmania* descrevendo a doença no homem e no cão junto a infecção por *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON, 2010).

No Brasil, até os anos 1990, a região Nordeste obtinha o maior número de casos, no entanto, fatores como o fluxo migratório, com a introdução de hospedeiros infectados associado à presença do vetor, aumento do desmatamento e alterações provocadas no ecossistema como consequência da ação humana propiciou a expansão da doença para regiões Centro-oeste, Sudeste e Nordeste (AGUIAR; RODRIGUES, 2017).

Em 2002, Shaw propôs uma mudança na classificação dos parasitos do subgênero *Leishmania*, dividindo *Leishmania* (L.) *infantum* em duas subespécies: *L. (L.) infantum infantum* (Velho Mundo) e *L. (L.) infantum chagasi* (Novo Mundo) (LAINSON, 2010).

Ainda há discussões acerca de subespécies e se as pequenas diferenças encontradas dos isolados americanos e europeus fariam jus a tal nomenclatura (DANTAS-TORRES, 2019a).

2.2 Agente Etiológico e Taxonomia

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* existindo mais de 20 espécies que infectam o homem e os animais. Os cães são infectados por pelo menos 13 dessas espécies (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022).

O agente etiológico da LV é protozoário *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. São parasitos difásicos cujo ciclo de vida envolve hospedeiros mamíferos e flebotomíneos que atuam como vetores. No vetor a forma promastigota é flagelada e extracelular, se desenvolve no intestino do flebotomíneo, enquanto no hospedeiro a forma amastigota (Figura 1) é intracelular obrigatória das células do sistema fagocítico mononuclear (BRASIL, 2006; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022).

Leishmania infantum compõe o complexo *Leishmania donovani* e a classificação taxonômica é a seguinte:

Reino: Protozoa Goldfuss, 1818

Filo: Euglenozoa Cavalier-Smith, 1998

Classe: Kinetoplastea: Honigberg, 1963

Ordem: Trypanosomatida Kent, 1880

Família: Trypanosomatidae Doflein, 1901

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903

Subgênero: *Leishmania* Ross, 1903 (LAINSON, 2010).

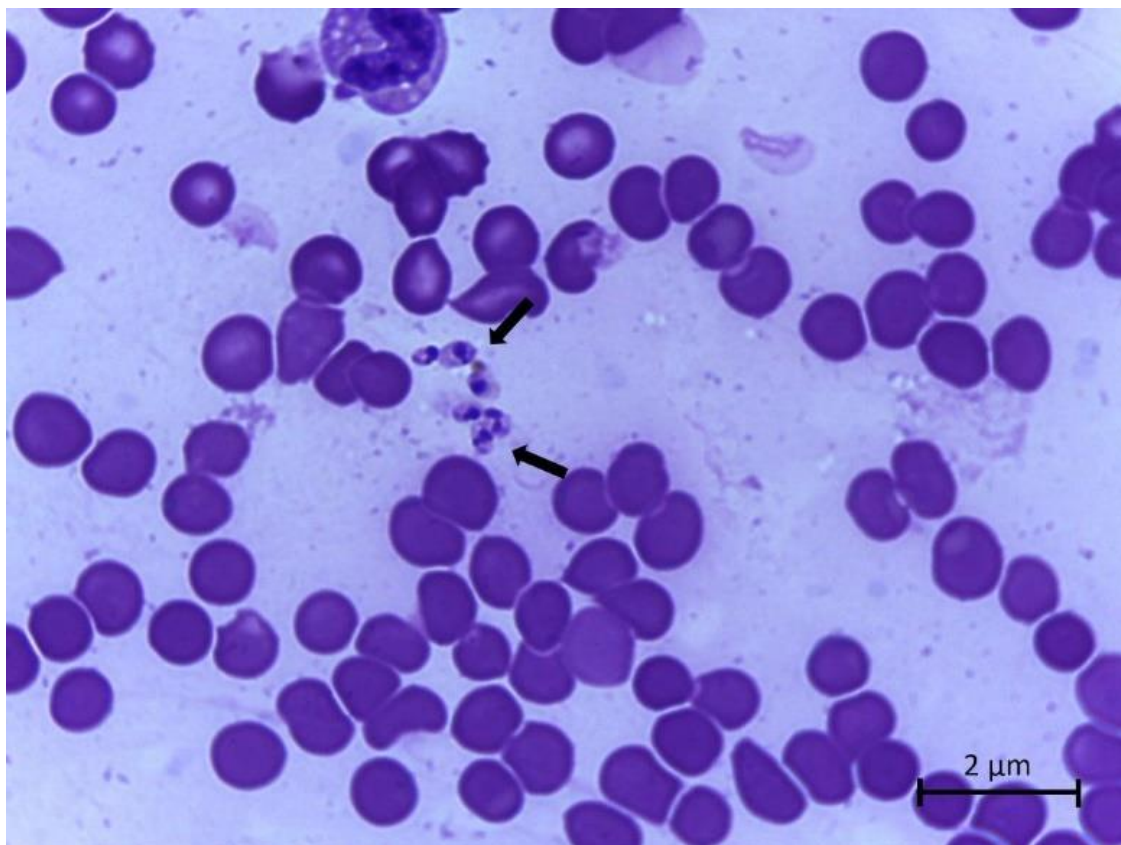


Figura 1 - Formas amastigotas de *Leishmania infantum* em citologia de medula óssea de um cão com leishmaniose visceral. Coloração Rosenfeld, Obj 100x.

2.3 Transmissão e ciclo biológico

A transmissão de *L. infantum* envolve flebotomíneos que atuam como os vetores do parasito. Os flebotomíneos são pequenos dípteros que pertencem ao gênero *Phlebotomus* (Europa, África e Ásia) e *Lutzomyia* (nas Américas). São insetos noturnos ativos do entardecer ao amanhecer que possuem capacidade de voo limitada. Nos países tropicais, como o Brasil, são encontrados durante todo o ano. No Hemisfério Norte são ativos de abril a outubro (BRASIL, 2006; MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022).

No Brasil, duas espécies de flebotomíneos estão relacionados com a infecção: *Lutzomyia longipalpis* - que é considerada a principal espécie transmissora da LV, e *Lutzomyia cruzi*, que é apontada como a principal espécie transmissora no Estado de Mato Grosso do Sul e alguns municípios de Mato Grosso (BRITO et al., 2014). A distribuição geográfica *L. longipalpis* abrange quatro das cinco regiões geográficas brasileiras, Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste. No Norte e no Nordeste era encontrado em matas, contudo houve

adaptação do vetor para ambiente rural atribuída a presença de animais silvestres e sinantrópicos. No final da década de 80, se estabelece a presença do vetor na área urbana, na periferia de grandes centros, observando-se o vetor no peridomicílio, intradomicílio, em galinheiros, chiqueiro, canil e paiol (BRASIL, 2014).

Popularmente, são conhecidos como mosquito palha, tatuquiras e birigui (BRASIL, 2014). São insetos pequenos que medem de 1 a 3 mm de comprimento, possuem corpo revestido por pelos com coloração castanho claro ou cor de palha. Na fase adulta, estão adaptados a diversos ambientes como: peridomicílio, galinheiros, chiqueiro, canil, paiol ou até mesmo intradomicílio. No entanto, na fase de larvas necessitam de ambiente terrestre rico em matéria orgânica e umidade com baixa incidência de luz. Machos e fêmeas se alimentam de néctar de plantas, mas a fêmea necessita também de sangue para desenvolvimento dos ovos (BRASIL, 2014; MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022).

No momento que a fêmea faz o repasto sanguíneo e ingere o macrófago infectado com amastigota (forma intracelular do protozoário), ocorre o rompimento dos macrófagos no tubo digestivo anterior, liberando as amastigotas que se reproduzem por divisão binária diferenciando-se em formas flageladas (promastigotas) que continuam a se reproduzir por divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas e colonizam esôfago e a faringe do flebótomo ficando aderidas ao epitélio da mucosa através do flagelo. Nesse momento, se diferenciam em promastigotas metacíclicas, que é a forma infectante. Esse ciclo leva em torno de 72 horas para ocorrer (BRASIL, 2006).

A forma promastigota metacíclica é liberada junto com a saliva do inseto durante o repasto sanguíneo. A partir da transmissão, na epiderme do hospedeiro, as promastigostas metacíclicas são fagocitadas pelos macrófagos e diferenciam-se em amastigotas (BRASIL, 2006). O macrófago envolve o parasito em um vacúolo fagossômico para tentar eliminá-lo mediante uma cascata de metabólitos à base de oxigênio envolvendo elementos como óxido nítrico e liberação de hidrolases lisossômicas descarregadas no interior do vacúolo do parasito. Se o protozoário evade dessa defesa não específica consegue sobreviver e se multiplica intensamente no macrófago, desse modo o número de amastigotas aumenta por fissão binária causando a ruptura da célula hospedeira

disseminando a infecção para outras células fagocíticas, ocorrendo então a disseminação hematogênica para linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Desse modo, o cão é considerado o principal reservatório doméstico do parasito no ambiente urbano, e se torna o agente responsável pela manutenção do protozoário no ciclo peri-doméstico (ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Formas secundárias de transmissão também são estudadas como a transmissão por transfusão sanguínea, transmissão venérea e transplacentária (BASANO; CAMARGO, 2004; BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017; CHAGAS et al., 2021; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Possuem pouco valor epidemiológico, mas grande importância clínica (BRASILEIHS, 2018).

2.4 Epidemiologia

Leishmania infantum é a principal espécie associada a LV na Europa, Ásia, África e Américas (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022). Ocorre em todos os continentes, com exceção da Oceania, sendo importante em saúde pública devido a sua letalidade em humanos (MARCONDES; DAY, 2019). É endêmica em 76 países e, no continente americano, ocorre em pelo menos 12 (BRASIL, 2023). Se configura como uma doença endêmica em países da África Oriental e região do Mediterrâneo Oriental como Iraque, Somália e Sudão. Nas Américas a LV é uma doença complexa de múltiplas variações no seu ciclo de transmissão, hospedeiros, reservatórios, vetores, manifestações clínicas e resposta à terapia (MARCONDES; DAY, 2019). Nos EUA e no Canadá acredita-se que a transmissão seja principalmente transplacentária, e não por flebotomíneos. As viagens e importação de cães e gatos infectados se torna uma importante preocupação em áreas endêmicas e não endêmicas (BANETH E SOLANO-GALLEGO, 2022).

É considerada uma doença negligenciada e, portanto, não se tem contabilizado ao certo o número de animais e humanos infectados, mas sabe-se que é uma doença de alta incidência (BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017). Pesquisas sorológicas estimam que em Portugal, Itália, França e Espanha tenham cerca de 2,5 milhões de cães estão infectados com *L. infantum*, desses

cães a maioria permanecem infectados subcl clinicamente sem manifestar a doença, assim também como ocorre na América do Sul (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022).

Em 2023, o Brasil registrou 92% dos casos no continente de LV em humanos (WHO, 2024), a infecção por *L. infantum* está presente em 26 estados das cinco regiões do país (BRITO; DIAS; SOUSA, 2019). Entre 2006 e 2015, foi observada no território brasileiro uma média anual de 3.509 casos, com Mato Grosso registrando em média 40 casos por ano (BRITO; DIAS; SOUSA, 2019). Em 2022 o Brasil registrou 1.184 casos, destes 105 foram registrados na região centro-oeste, sendo 18 em Mato Grosso (BRASIL, 2023). Dados acerca da situação epidemiológica da LV no Brasil apontam aumento na letalidade, passando de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012 (BARSIL, 2023). Sendo que no período de 2013 a 2022, o Nordeste registrou o maior número de casos em LV do Brasil, seguido da região Norte, Sudeste, Centro Oeste e Sul, respectivamente (BRASIL, 2023).

Em Mato Grosso é uma doença endêmica, em Cuiabá os inquéritos epidemiológicos determinam uma prevalência de 22,1% de LVC (ALMEIDA et al., 2012), Jaciara 35,5% (BRITO et al., 2014) e em Barão de Melgaço 4,2% (DIAS et al., 2017). Brito; Dias; Sousa (2019) apontam os municípios do Pantanal Mato-Grossense, Barão de Melgaço, Nossa Senhora do Livramento, Itiquira, Cáceres e Poconé com alta incidência de LV.

2.5 Patogenia e características clínicas da LVC

No cão, a patogênese da doença depende de fatores como genética do hospedeiro, estilo de vida, estado imunológico do hospedeiro e virulência do parasito (BOTANA et al., 2018; KUMAR; NYLÉN, 2012). Os sinais clínicos e tipos de lesões que os cães infectados apresentam se modificam devido a fatores específicos ao organismo de cada indivíduo, que estão diretamente relacionados à resposta imunológica, ao tempo de evolução da doença e da carga parasitária presente no organismo (CASTRO et al., 2012; GONÇALVES et al., 2019). Os cães podem apresentar uma grande variedade de perfis clínicos, desde aparentemente saudáveis a severamente doentes (ROSÁRIO et al., 2019).

Nos cães o resultado da infecção após a picada do flebotomíneo decorre do delicado equilíbrio entre a virulência do parasito e a resposta imunológica imediata e de longo prazo do organismo infectado. Se o cão desenvolve uma resposta imunológica do tipo celular (Th1) por meio do interferon gama, fator de necrose tumoral e interleucina 2 (IL2), são capazes de ativar os macrófagos que geram óxido nítrico e outras substâncias oxidativas conseguindo dessa forma eliminar o parasito e controlar a infecção. Em contraste, uma resposta imunológica do tipo humoral (Th2) que envolve predominantemente a secreção de interleucina 4 (IL4), linfócitos de células B em células plasmáticas leva a hiperglobulinemia associando-se a infecção não controlada e a progressão da doença clínica. A hiperglamaglobulinemia e a alta carga parasitária estão associadas à formação de complexos imunes circulantes que podem se depositar nos rins e em outros órgãos (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022).

Dentre os órgãos afetados pela doença, o rim é comumente acometido. A glomerulonefrite decorre da deposição de imunocomplexo com proteinúria, leva a perda de albumina através dos glomérulos danificados. A doença renal pode ser a única manifestação clínica da LVC podendo progredir da proteinúria para síndrome nefrótica ou para doença renal em estágio terminal. A doença renal crônica é uma consequência grave da progressão da LVC, descrita como a principal causa de mortalidade em cães doentes (BANETH et al., 2018).

A progressão da LVC é marcada por uma depressão da resposta imunológica mediada por células em detrimento de uma resposta humoral excessiva. Cães infectados naturalmente passam por um período de incubação variável (pelo menos três meses), aqueles que forem resistentes a doença pode desenvolver baixos títulos de anticorpos e permanecer infectados subcl clinicamente durante toda a vida (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022; MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022). Outra possibilidade é manifestação de sinal clínico após supressão do sistema imunológico decorrente de outra comorbidade como neoplasia, doença endócrina ou doença infecciosa concomitante (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022; OLIVA et al., 2010).

A medula óssea também é um órgão bastante afetado podendo ser intensamente parasitado. A infecção por *L. infantum* nesse órgão está relacionada a persistência da doença bem como casos de recidivas após

tratamento clínico. Sabe-se que o parasitismo na medula óssea altera os mecanismos de produção celular levando a quadros de pancitopenia e anemia não regenerativa, hiperplasia histiocitária e hipoplasia eritrocítica levando a aplasia medular. Outro órgão afetado pela doença é o fígado. O parasitismo pela *L. infantum* nos macrófagos hepáticos e células de Kupffer geram uma inflamação que pode levar a formação e maturação de granulomas (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022).

Os cães de várias raças, entre elas, Pastor Alemão, Boxer, Cocker Spaniel, Doberman Pinscher e Rottweiler (BANETH; SOLANO-GALLEGÓ et al., 2022; SOLANO-GALLEGÓ et al., 2011) são suscetíveis ao desenvolvimento da LV. Em contrapartida o Ibizaian Hound apresenta resistência aos sinais clínicos de LV decorrente da eficaz resposta imunológica celular. A idade também se configura como um importante fator, sendo cães menores de três anos e maiores de oito anos apontados como mais propensos ao desenvolvimento da infecção (SOLANO-GALLEGÓ et al., 2011). Estudos genéticos apontam que a doença tende a desenvolver com maior facilidade em cães com polimorfismo do gene *Slc11c1* (Solute carrier family 11 member a1) que codifica uma proteína transportadora de ferro responsável pelo controle da replicação dos parasitos e da ativação dos macrófagos, propondo que cães suscetíveis a LV possam apresentar mutação neste gene (SANCHEZ-ROBERT et al., 2008). Cães portadores de certos alelos dos genes MHC II também foram descritos como suscetíveis ao desenvolvimento da doença (QUINNELL et al., 2003).

Os sinais clínicos da LVC são variáveis e não patognômicos, e estão relacionados a reação inflamatória granulomatosa decorrente da presença dos macrófagos infectados por *L. infantum*, sendo frequentemente observados: hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia generalizada – que ocorre da hipertrofia na estrutura do linfonodo, sem relação com a carga parasitária no tecido ou estado clínico do cão (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022). Outros sinais são: apatia, caquexia, mucosas pálidas, anorexia, hiporexia ou aumento do apetite, poliúria e polidipsia, vômito e diarreia (nos casos de colite crônica) (BANETH; SOLANO-GALLEGÓ, 2022; SOLANO-GALLEGÓ et al., 2011).

A epistaxe é um dos sinais clínicos descritos em cães com LV. Possui causa multifatorial e inclui: trombocitopenia, trombocitopatia, hiperviscosidade

sérica decorrente da hiperglobulinemia, rinite linfoplasmocitária ou piogranulomatosa com ou sem presença de ulceração da mucosa nasal (BANETH et al., 2018).

As lesões oculares também são comuns, estudos apontam uma prevalência de 16 a 80% (MARTÍNEZ et al., 2011). Dentre as alterações oculares estão: blefarite esfoliativa, ulcerativa ou nodular. Conjuntivite nodular, ceratoconjuntivite seca e uveíte anterior/endoftalmite. Os cães também podem apresentar hematúria e diarreia hemorrágica devido aos distúrbios de coagulação da doença. A claudicação estará presente em casos de poliartrite erosiva ou não erosiva, osteomielite e polimiosite. É descrito também miosite mastigatória atrófica, distúrbios vasculares como vasculite sistêmica e tromboembolismo arterial e alterações neurológicas (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

2.6 A pele e a LVC

A pele é o primeiro órgão infectado pela *L. infantum* desempenhando importante função, uma vez a presença do parasito nesse órgão é necessária para que ocorra a transmissão para o vetor (ARUMUGAM; SCORZA; PETERSEN, 2022). Estudos apontam que o tipo de interação entre as células da derme e o parasito determinaria a disseminação do protozoário no organismo do cão. A carga parasitária cutânea varia e pode aumentar com a gravidade da doença e está correlacionada com a infectividade ao vetor (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022), indicando a importância da carga parasitária cutânea que pode levar o cão a desempenhar papel de super disseminadores (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022; SCORZA et al., 2021).

A pele, desempenha uma importante função na imunopatogênese da LVC. Após a inoculação da promastigota de *Leishmania* na derme do cão pelo vetor (PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015), os sinais clínicos dependerão das interações entre o parasita e a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (MARTÍNEZ-FLÓRES et al., 2023). O envolvimento cutâneo na leishmaniose visceral canina gera inflamação ao redor dos folículos pilosos, glândulas sebáceas, perivasculares e na derme superficial. Esse infiltrado inflamatório é

composto predominantemente por macrófagos (onde são observadas as formas amastigotas do protozoário), seguidos de plasmócitos, linfócitos e poucos neutrófilos (JACINTO, 2012; ORDEIX et al., 2017). No exame histopatológico, da pele clinicamente lesionada de cães com LV são descritas alterações como:

- **Epiderme:** hiperplasia epidérmica, degeneração vacuolar de células basais epidérmicas, exocitose linfocítica, ulceração e hiperkeratose ortoqueratótica ou paraqueratótica e crostas (ORDEIX et al., 2017; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005).
- **Derme:**
 - Dermatite perivascular em derme superficial ou profunda
 - Dermatite intersticial
 - Dermatite nodular
 - Perifoliculite
 - Dermatite perisebácea
 - Dermatite periécrina
 - Adenite sebácea
 - Inflamação piogranulomatosa
 - Inflamação granulomatosa
 - Em alguns casos é possível observar formas amastigotas compatíveis com *Leishmania* (ORDEIX et al., 2017; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005).
- **Panículo:** paniculite lobular (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005).
- **Histopatologia da onicogribose:** dermatite liquenóide e mononuclear variando de leve a grave com ausência de amastigotas.

Estudos evidenciam que a pele normal de cães com LV, com ou sem dermatopatias, apresenta lesões microscópicas, observando-se também as formas amastigotas (SARIDOMICHELAKIS; KOUTRINAS, 2014). Cães, em diferentes estágios clínicos da LV podem apresentar diferenças na frequência das lesões microscópicas e na carga parasitária com padrão inflamatório perivascular ou intersticial em derme superficial e média. A intensidade da inflamação pode variar de leve a moderada com observação de macrófagos,

linfócitos e plasmócitos além de estruturas compatíveis com formas amastigotas no interior de macrófagos (ORDEIX et al., 2017).

As lesões cutâneas são a manifestação mais comum da doença podendo estar associadas a outros sinais clínicos ou anormalidades clínico-patológicas (ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010; AYRES et al., 2022). Na pele, esses sinais clínicos se caracterizam por diferentes padrões de lesões tais como:

- **Dermatite esfoliativa** - pode ser multifocal ou difusa localizando-se em cabeça, face dorsal do tronco, pavilhão auricular e membros e caracteriza-se por hipotricose/alopecia, descamação profusa e xerose cutânea, com ou sem eritema e/ou hiperpigmentação e pelagem quebradiça e sem brilho. Não é pruriginosa (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015). A hiperqueratose nasodigital é uma forma localizada da dermatite esfoliativa relacionada ao acúmulo excessivo de estrato córneo (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).
- **Dermatite erodo-ulcerativa** – as úlceras ocorrem em consequência de traumas e/ou vasculite. Comumente localizam-se nas margens das orelhas, membros e junções mucocutâneas (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).
- **Dermatite nodular** – pode ser focal ou multifocal. É caracterizada por uma dermatite granulomatosa grave com presença de alto número de amastigotas. Pode indicar uma ineficiente ou forte imunidade celular do cão (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).
- **Dermatite papular** - é uma lesão típica em cães de áreas endêmicas e considerada uma apresentação leve da LVC (estágio I - Leishvet) (ORDEIX et al., 2017), associada a uma boa reposta imunológica do tipo celular (Th1) e baixa resposta imune humoral. Desse modo, nos cães com dermatite papular estão ausentes os sinais clínicos sistêmicos bem como anormalidades laboratoriais e os títulos de anticorpos estão negativos ou baixos. Eles tentam cicatrizar sozinhas e podendo levar de três a seis meses. Estudos indicam que a dermatite papular tende a ser mais comum no

primeiro contato do parasito com o sistema imunológico do cão (MATÍNEZ-FLÓRES et al., 2023; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

- **Onicogribose** – hipertrofia e aumento da curvatura das unhas (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).
- **São descritas também lesões ulcerativas ou nodulares mucocutâneas ou em mucosa oral, nasal e genital e dermatite pustulosa** (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Essa grande variação clínica de padrão de lesão ocorre em razão de uma variedade de mecanismos patológicos que ocorrem secundariamente à inflamação, deposição de imunocomplexos, produção de autoanticorpos e a capacidade do sistema imunológico do cão controlar a multiplicação do parasito e a invasão tecidual (ORDEIX et al., 2017). Pode haver também doenças de peles coexistentes, como sarna sarcóptica, dermatite atópica, neoplasias nodulares ou ulcerativas ou doenças de pele complicadoras, como dermatofitose, malasseziose, demodicose ou piodermite bacteriana (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).



Figura 2 – (A) Dermatite ulcerativa em junção mucocutânea de cão, macho, 07 anos de idade com leishmaniose visceral. (B) Hiperqueratose nasal de cão, macho com 07 anos de idade com leishmaniose visceral. (C) Dermatite ulcerativa, dermatite esfoliativa com hipotricose e onicogribose em membro torácico de cão, fêmea, 07 anos de idade com leishmaniose visceral. Hiperqueratose nasal de cão, macho com 07 anos de idade com leishmaniose visceral. (D) Dermatite ulcerativa em focinho de cão, macho, 04 anos de idade com leishmaniose visceral.



Figura 3 – Hiperqueratose em face (A), orelha (B) e nariz de cão (C), fêmea, 05 anos de idade com leishmaniose visceral.



Figura 4 – (A e B) Dermatite esfoliativa em face e membros, alopecia periocular e em focinho e orelhas de cão fêmea, 01 ano de idade com leishmaniose visceral.

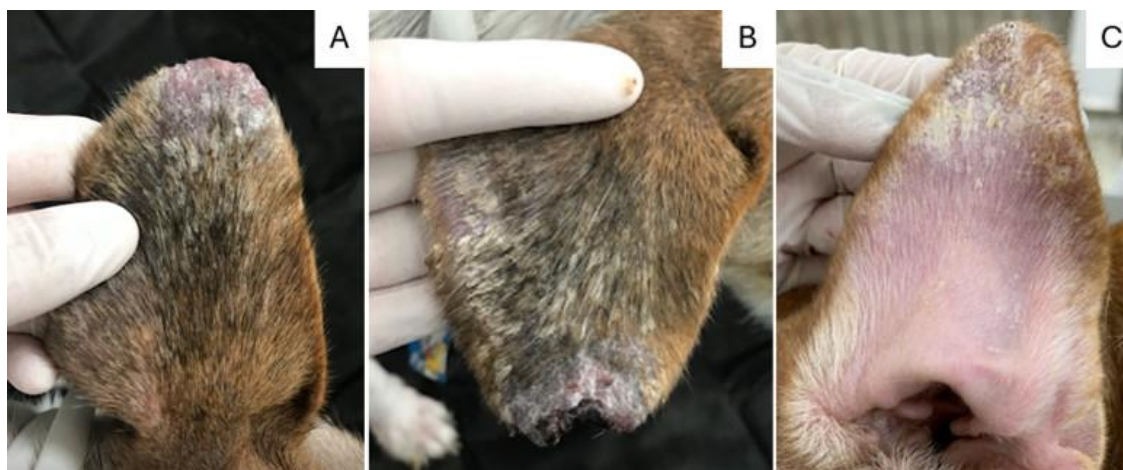


Figura 5 – (A e B) Dermatite esfoliativa, alopecia/hipotricose e dermatite ulcerativa em ponta de orelha de cão, macho, 04 anos de idade com leishmaniose visceral. (C) Dermatite esfoliativa em ponta de orelha de cão, macho, 05 anos idade com leishmaniose visceral.

2.7 Estadiamento clínico na LVC

O grupo de pesquisadores que formam o Leishvet propuseram o estadiamento da LVC em quatro estádios de acordo com sinais clínicos, estado sorológico e achados laboratoriais com objetivo de auxiliar o clínico na escolha da melhor conduta terapêutica para cada caso (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Brasileish (2018) propõem um estadiamento clínico da LVC em cinco estádios, baseado na realidade da América do Sul, a partir do estadiamento proposto pelo Leishvet (Quadro 1 a 5).

Quadro 1 - Estádio I da LVC, sorologia, sinais clínicos, achados laboratoriais e prognóstico.

Estádio I	
Sorologia	Sorologia negativa ou baixo título de anticorpos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Sorologia com baixo ou médio título de anticorpos/ exame parasitológico negativo (BRASILEISH, 2018).
Sinais clínicos	Cães com sinais clínicos leves: linfadenomegalia periférica ou dermatite papular (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Ausentes (BRASILEISH, 2018).

Achados laboratoriais	Não são observadas anormalidades clínico-patológicas Perfil renal normal: creatinina menor 1,4 mg/dl; não proteinúrico, UPC < 0,5 (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Sem alterações (BRASILEISH, 2018).
Prognóstico	Bom (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BRASILEISH, 2018).

Quadro 2- Estádio II da LVC, sorologia, sinais clínicos, achados laboratoriais e prognóstico.

Estádio II	
Sorologia	Baixo/alto títulos de anticorpos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Sorologia com baixo ou médio título de anticorpos/ exame parasitológico positivo (BRASILEISH, 2018).
Sinais clínicos	Sinais listados no estágio I, somados a dermatite esfoliativa, onicogrifose, ulcerações de plano nasal, coxins, proeminências ósseas, junções mucocutâneas, anorexia, emagrecimento, febre e epistaxe (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Ausentes/leves (linfadenopatia periférica, dermatite papular) (BRASILEISH, 2018).
Achados laboratoriais	Anemia leve não regenerativa, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade Subestádios:

	a) Perfil renal normal: creatinina <1,4mg/dL e UPC <0,5 b) Creatinina <1,4mg/dL e UPC =0,5 – 1 (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Sem alterações com perfil renal normal (BRASILEISH, 2018).
Prognóstico	Bom/reservado (LEISHVET et al., 2011). Bom (BRASILEISH, 2018).

Quadro 3 - Estádio III da LVC, sorologia, sinais clínicos, achados laboratoriais e prognóstico.

Estádio III	
Sorologia	Médio a altos títulos de anticorpos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Sorologia com baixo/alto título de anticorpos/ exame parasitológico positivo (BRASILEISH, 2018).
Sinais clínicos	Sinais clínicos listados nos estádios I e II, lesões decorrentes da deposição de imunocomplexos como vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Sinais clínicos listados no estágio II somados a onicogrifose, dermatite esfoliativa/ulcerativa, anorexia, epistaxe, febre, emagrecimento (BRASILEISH, 2018).
Achados laboratoriais	Anormalidades clínico patológicas listadas no estágio II, doença renal crônica (IRIS estágio I com UPC >1 ou estágio II, creatinina 1,4 – 2

	mg/dL) (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Anemia não regenerativa leve, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade do soro (proteínas totais > 12g/dl) Subestádios: a) Perfil renal normal (creatinina <1,4 mg/dl; UPC<0,5) b) Creatinina <1,4 mg/dl; UPC = 0,5-1 (BRASILEISH, 2018).
Prognóstico	Reservado/desfavorável (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Bom a reservado (BRASILEISH, 2018).

Quadro 4 - Estádio IV da LVC, sorologia, sinais clínicos, achados laboratoriais e prognóstico.

Estádio IV	
Sorologia	Médio a altos títulos de anticorpos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Sorologia com médio/alto título de anticorpos/ exame parasitológico positivo (BRASILEISH, 2018).
Sinais clínicos	Sinais clínicos listados em estágio III, tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótica e insuficiência renal terminal (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Sinais clínicos listados no estágio III e os associados por leões decorrentes da deposição de imunocomplexo: vasculite, artrite,

	uveíte e glomerulonefrite (BRASILEISH, 2018).
Achados laboratoriais	Anormalidades clínico-patológicas listadas no estágio II e no IRIS e estágio III (creatinina 2 – 5 mg/dL) e estágio IV (creatinina > 5 mg/dL), síndrome nefrótica: proteinúria acentuada UPC >5 (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Alterações do estágio III, doença renal crônica (DRC) em estágio I (IRIS): UPC >1 ou creatinina 1,4-2 mg/dl
Prognóstico	Desfavorável (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Reservado/pobre (BRASILEISH, 2018).

Quadro 5 - Estádio V da LVC, sorologia, sinais clínicos, achados laboratoriais e prognóstico.

Estádio V	
Sorologia	Sorologia com médio/alto título de anticorpos/ exame parasitológico positivo (BRASILEISH, 2018).
Sinais clínicos	Sinais clínicos listados em estágio IV, tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótica e insuficiência renal terminal (BRASILEISH, 2018).
Achados laboratoriais	Anormalidades clínico-patológicas listadas no estágio IV, DRC (IRIS) no estágio III (creatinina 2,1-5 mg/dl) e IV (creatinina >5mg/dl), síndrome nefrótica (UPC >5) (BRASILEISH, 2018).

Prognóstico	Pobre (BRASILEISH, 2018).
-------------	---------------------------

Outro sistema de estadiamento clínico da LVC é de acordo com Oliva et al (2010) que também classificam os cães de acordo com os testes sorológicos ou pela detecção direta do parasito como parasitológico ou a PCR. Desta forma, são classificados em quatro estádios clínicos: A, B, C, D e E que se subdivide em E-a e E-b.

- **Estádio A - Cães expostos**

Cães clinicamente saudáveis ou que apresentam sinais clínicos associados a outras doenças, mas que vivem ou foram para áreas geográficas com presença do flebotomíneo vetor da *L. infantum*. Nos exames citológicos, histopatológicos, moleculares e sorológicos negativos.

- **Estádio B - Cães infectados**

Cães clinicamente saudáveis ou que apresentam sinais clínicos associados a outras doenças. No exame parasitológico positivo e sorológico com baixo título de anticorpos. PCR positiva a partir de amostras de sangue ou pele obtidas durante o período de transmissão da infecção, sem sinais clínicos evidentes, pode não ser suficiente para considerar um cão infectado.

- **Estádio C - Cães doentes**

Cães com um ou mais sinais clínicos compatíveis com LV ou com alterações hematológicas, bioquímicas e urinárias comumente associadas a doença clínica. Deve-se considerar também alterações laboratoriais que não sejam comuns, mas que também possam ser indicativas. O exame parasitológico positivo e altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*.

- **Estádio D - Cães doentes**

Cães com evidência de nefropatia proteinúrica ou insuficiência renal, doença ocular (causando perda funcional), artrite (com prejuízo a mobilidade) relacionados ou não a LVC com indicação de tratamento imunossupressor. Doenças concomitantes como coinfeções, neoplasias, endocrinopatias e ausência de resposta clínica ao tratamento da LV.

- **Estádio E – estágio adicional para fins terapêuticos, com os subestádios:**

- **Estádio E-a: Doente não responsivo**

Cães que não respondem ao tratamento recomendado.

- **Estádio E-b: Recidiva precoce**

Cães doentes tratados de acordo com protocolo terapêutico indicado, mas que recidivam logo após o final do tratamento (OLIVA et al., 2010).

Proverbio et al. (2014a) propõem uma escala para pontuação de sinais clínicos atribuídos a LVC, sendo:

- Nota 0, quando o sinal clínico não está presente
- Nota 1, para sinal leve
- Nota 2, para sinal moderado
- Nota 3, para sinal clínico grave

Ao final da avaliação, os pontos são somados e tem-se então o escore clínico que pode ir de 0 a 87 pontos. Dentre os sinais clínicos avaliados estão: apetite, estado mental, letargia, perda de peso, poliúria, polidipsia, relação proteína creatinina urinária (UPC), atrofia de músculo temporal, atrofia muscular generalizada, linfadenomegalia, esplenomegalia, conjuntivite e/ou blefarite, uveíte e/ou ceratite, palidez de mucosas, epistaxe, úlceras ou nódulos na boca, vômito, diarreia, claudicação, prurido, eritema, dermatite ulcerativa, dermatite nodular, dermatite pustular estéril, alopecia, alteração de pigmentação, hiperqueratose de plano nasal ou coxins, hiperqueratose generalizada e onicogribose. A determinação do escore clínico pode ser utilizada para acompanhamento do tratamento em cães doentes (PROVERBIO et al., 2014a).

2.8 Achados laboratoriais

Cães com suspeita de LVC devem passar por avaliação completa que incluem além do exame físico e oftalmológico (considerando o acometimento desse órgão na doença), o hemograma, bioquímica sérica e exame de urina com avaliação da relação proteína creatinina urinária (UPC).

Dentre as alterações no hemograma podem ser observados: anemia normocítica, normocrômica e não regenerativa leve a moderada, leucocitose,

leucopenia, monocitose, linfopenia, neutrofilia, neutropenia, trombocitopenia ou trombocitose. Também pode haver trombocitopatias ou distúrbios de hemostasia secundária a fibrinólise e anemia hemolítica (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022; BRASILEISH, 2018).

No perfil bioquímico: azotemia renal (aumento ureia e creatinina) pode ser um achado. A elevação da atividade sérica das enzimas hepáticas como alanina aminotransferase (ALT) e aumento dos níveis de colesterol, são menos frequentes, mas podem ocorrer. O perfil de proteínas séricas pode apontar hiperglobulinemia (beta policlonal e/ou gamaglobulinemia), hipoalbuminemia e relação albumina/globulina abaixo do valor de referência. Cerca de 73% dos cães podem apresentar aumentos de gamaglobulinas enquanto, 68% têm aumento das betaglobulinas, 55% apresentam hipoalbuminemia e a diminuição da relação albumina/globulina pode estar presente em 78% dos cães com LV (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022).

Na urinálise: a proteinúria com aumento da relação da proteína/creatinina urinária (UPC) é relatado em 48% dos cães com LV (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022). A proteinúria é um achado frequente na LVC e a relação proteína/creatinina urinária (UPC) é um importante parâmetro no estadiamento clínico da doença (BANETH et al., 2018). São observadas também diminuição da densidade urinária (BRASILEISH, 2018).

Além disso, proteínas de fase aguda como a Proteína C reativa, ferritina, haptoglobina podem ser utilizadas como marcadores de respostas ao tratamento, elas aumentam com a evolução da doença. Já a proteína de fase aguda negativa paraxonase 1 (PON 1) diminui durante o curso da LVC. A albumina também é considerada uma proteína de fase aguda negativa que diminui durante a doença independente da presença de proteinúria (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022).

2.9 Diagnóstico

O diagnóstico da LVC é complexo e pode ser difícil devido a variedade de sinais clínicos, anormalidades clínico patológicas e a recorrente infecção subclínica. Cães infectados subclínicamente podem não apresentar alterações clínicas e patológicas permanecendo infectados por longos períodos ou

apresentar alterações de forma lenta na medida com que a doença progride. Cada uma dessas formas de apresentações clínicas exige um método de diagnóstico, desse modo as indicações de diagnóstico para LVC são variáveis (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

2.9.1 Diagnóstico parasitológico

Os métodos de diagnósticos parasitológicos incluem citologia, histopatologia e a cultura (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022).

A citologia permite a observação das formas amastigotas em esfregaços de medula óssea, linfonodo, punção hepática, esplênica, por escarificação da pele ou punção de nódulos cutâneos. É um exame conclusivo uma vez que permite a visualização do parasito no material biológico, desse modo apresenta especificidade de 100%, contudo a sensibilidade varia de acordo com a carga parasitária e o tecido pesquisado (DIAS et al., 2020) apontando 80% para cães sintomáticos e menos ainda para os assintomáticos (BRASIL, 2006). As lâminas com amostras clínicas podem ser submetidas a coloração do tipo Romanowsky, como May Gruwald-Giemsa, ou corantes comerciais rápidos e visualizadas em microscopia de luz que permite a observação das formas amastigotas no citoplasma dos macrófagos e mais raramente em neutrófilos ou fora das células. Elas possuem de 1 a 4 µm de comprimento por 1 a 2 µm de largura contendo um núcleo proeminente e uma estrutura citoplasmática em forma de bastonete, o cinetoplasto (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022). A visualização do parasito por citologia nem sempre é possível decorrente do baixo número de amastigotas visíveis, mesmo em cães com doença clínica completa (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022).

A histopatologia apresenta a vantagem de possibilitar informações a respeito do padrão de lesão, permitindo, dessa forma, diferenciar lesões que podem ou não estar relacionadas com a LVC. No entanto, a visualização das formas amastigotas no tecido infectado é difícil (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022). Nesse caso, a coloração imuno-histoquímica pode ser usada para aumentar a sensibilidade de detecção do parasito no tecido (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Dentre as vantagens da citologia/histopatologia, estão: 1) permitir a detecção direta do próprio agente etiológico além de excluir outros diagnósticos diferenciais; 2) citologia de medula óssea e linfonodo é um método rápido. Entre as desvantagens estão: 1) baixa sensibilidade, requer a realização de outros exames para complemento diagnóstico como imuno-histoquímica e/ou Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) quando os parasitos não são visualizados; 2) não revela o estado imunológico do cão; 3) é necessário experiência do examinador (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A cultura é utilizada para identificação de cepas de *Leishmania*. O isolamento é realizado em meio de cultura mantidas entre 24 e 26° e observadas em microscópio semanalmente por quatro semanas para visualização das formas promastigotas. Não é utilizada como método diagnóstico de rotina, uma vez que requer tempo e pela grande variabilidade na taxa de crescimento entre as cepas de parasitos e pela variação de carga parasitária entre tecidos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). O linfonodo poplíteo é o órgão mais acessível para cultura apresentando entre 64% e 100% de positividade em cães sintomáticos em cães com títulos de anticorpos igual ou maior que 1:80 (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Dentre as vantagens da cultura são listadas 1) possibilidade do isolamento do parasito e 2) a identificação isoenzimática. No entanto, é uma técnica demorada e trabalhosa realizada apenas para fins científicos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

2.9.2 Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos permitem a detecção qualitativa ou quantitativa de anticorpos séricos. Dentre os testes qualitativos, encontram-se os testes imunocromatográficos e o Dot-ELISA (SNAP Leishmania®, IDEXX). Eles são de rápida e fácil execução, permitem a análise de amostragem elevada em curto intervalo de tempo e dispensam equipamentos laboratoriais ou pessoal altamente treinado (RIBEIRO et al., 2019). O Ministério da Saúde do Brasil adota o TR-DPP® Bio-Maguinhos/FIOCRUZ para triagem dos cães suspeitos de LVC (BRASIL, 2011). Nos testes imunocromatográficos são utilizados antígenos recombinantes rK28 (quimera que combina os antígenos K9, K26 e K39) (TR-DPP® Bio-Maguinhos/FIOCRUZ) ou fragmentos imunogênicos da proteína

rk39/rk26 de *L. infantum* (SensPERT® *Leishmania*, Dechra). Contudo, são considerados testes de triagem e devem ser associados às técnicas sorológicas quantitativas (RIBEIRO et al., 2019), como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (PROVERBIO et al., 2014b) e o ensaio imunoenzimático (ELISA).

A sorologia quantitativa tem maior probabilidade de ser reagente em comparação aos testes citológicos em cães com baixa carga parasitária ou subcl clinicamente infectados, sendo umas das principais técnicas utilizadas para diagnóstico da LVC. Além disso, os testes sorológicos quantitativos são utilizados para o monitoramento dos cães sob tratamento. A vantagem da sorologia está na possibilidade da determinação dos títulos de anticorpos que é essencial para o diagnóstico e estabelecimento de um prognóstico. Em contrapartida tem a possibilidade de reações cruzadas com outras espécies de tripanossomatídeos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Sabe-se que cães doentes com altos níveis de anticorpos também apresentam altos níveis de parasitemia (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2023).

2.9.3 Diagnóstico molecular

Os testes moleculares apresentam alta sensibilidade e especificidade. A reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui-se uma forma de diagnóstico acessível para o diagnóstico da LVC e a identificação de espécies de *Leishmania*, podendo ser realizado de uma grande variedade de amostras, tais como sangue, medula óssea, aspirado de linfonodo, *swabs* conjuntivais e orais ou fragmentos de tecido obtidos por biópsia (MARTÍNEZ et al., 2011). A sensibilidade e especificidade desse exame depende de fatores como a técnica de PCR empregada e a sequência de DNA alvo utilizada (ALMEIDA et al., 2012, DIAS et al., 2020). Dentre as vantagens da PCR podem ser citadas a pequena quantidade de material biológico necessário para realização do exame e a diferenciação dos agentes através da análise de pleomorfismo dos alvos. (BHATTARAI et al., 2009; SILVA et al., 2010). Os alvos são importantes devido a sua sensibilidade e especificidade (SILVA et al., 2010).

Diferentes ensaios de PCR com uma variedade de sequências alvo do parasito de DNA genômico (que tem como alvos partes da *Leishmania*) ou DNA cinetoplasto (kDNA) são usados para diagnóstico da infecção (BANETH E

SOLANO-GALLEGO, 2022). O kDNA representa cerca de 20% do DNA do parasito (SILVA et al., 2010), é mais sensível que os ensaios de DNA genômico, porém é apenas indicativo de infecção uma vez que não identifica a espécie (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022). A PCR para ITS-1 rDNA apresenta bom valor diagnóstico uma vez que possibilita a identificação de quase todas as espécies de *Leishmania* clinicamente relevantes (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022; MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022).

Martínez et al. (2011) citam as vantagens da PCR quantitativa (qPCR) não só para diagnóstico, mas também para controle e monitoramento da doença bem como o prognóstico através de categorias para valores de corte da qPCR em sangue e medula óssea considerando:

- I. 0-10 parasitos/ml de sangue e 0-100 ml de parasitos/ml de medula óssea
baixo positivo
- II. 10-100 parasitos/ml de sangue e 100-1.000 parasitos/ml de medula óssea
médio positivo
- III. 100-1.000 parasitos/ml de sangue e 1.000 – 10.000 parasitos/ml de
medula óssea alto positivo
- IV. >1.000 parasitos/ml de sangue e >10.000 parasitos ml de medula óssea
muito alto positivo

Concluindo que cães que apresentam carga parasitária alta ou muito alta estão doentes ou ficarão doentes. Em casos de cães assintomáticos recomenda que o exame seja realizado a partir do aspirado linfonodo ou amostra de medula óssea. A qPCR é importante para monitoramento do tratamento principalmente nos casos que é necessário repetir protocolo terapêutico e na detecção de possíveis recidivas evitando assim a doença clínica (MARTÍNEZ et al., 2011).

Dentre as vantagens dos testes moleculares estão: 1) detecção de DNA de *Leishmania*; 2) alta sensibilidade (kDNA) e 3) possibilidade da quantificação da carga parasitária com a qPCR. Dentre as desvantagens estão: 1) possibilidade de falsos positivos devido a contaminação do DNA; 2) diferentes padronizações usadas por diferentes laboratórios de diagnóstico; 3) não permite a avaliação do estado imunológico do cão e 4) não é indicado como única técnica para diagnóstico, uma vez que um resultado positivo para *L. infantum* apenas confirma a infecção e não a doença clínica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

As diretrizes Leishvet (2011) recomendam o uso da sorologia quantitativa como principal teste diagnóstico em cães com sinais clínicos suspeitos de leishmaniose visceral ou com alterações hematológicas e bioquímicas séricas compatíveis com a doença. Títulos moderados de anticorpos anti-*Leishmania* associados a achados clínicos compatíveis com a doença são considerados suficientes para conclusão do diagnóstico. A PCR, citologia e histopatologia podem auxiliar no diagnóstico de cães com resultados sorológicos inconclusivos. Recomenda-se a associação de sorologia e PCR para diagnosticar cães com infecção subclínica e para triagem de doadores de sangue (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

2.10 Tratamento e Prognóstico

O tratamento é indicado de acordo com estágio clínico (BRASILEISH, 2018; SOLANO-GALLEGO, 2011) do cão infectado, é prolongado e a cura clínica pode ocorrer naqueles cães que não estão no estágio progressivo da doença. A cura parasitológica não é alcançada e o cão doente precisa de monitoramento constante a fim de detectar possíveis recaídas. A resposta clínica ao tratamento de cães doentes varia conforme o estado clínico geral pré-tratamento e a resposta à terapia instituída. Cães com acometimento renal possuem uma recuperação inferior quando comparado aos cães sem comprometimento renal ou que apresentam uma proteinúria leve (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022). Dentre as drogas utilizadas em cães para tratamento da LV estão: miltefosina, alopurinol e antimoniato de meglumina (Tabela 1 e 2) (MANNA et al., 2008).

Com vista ao tratamento dos cães com LVC, em 2016 foi aprovado no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a miltefosina, sendo a única medicação permitida no Brasil para tratamento da LVC. Uma alquifosfocolina, que foi desenvolvida como tratamento contra câncer (MANNA et al., 2008; OLIVA et al., 2010), sendo que mais tarde observou-se que o fármaco possui atividade leishmanicida, uma vez que age inibindo o crescimento das formas promastigotas e causa a morte das formas amastigotas do parasito, possuindo assim ampla atividade antiparasitária e atuando independente do sistema imunológico do cão afetado (VIDES et al., 2018). Nogueira et al. (2019) em estudo acerca do tratamento com miltefosina revelou

melhora clínica com redução da infectividade em cães infectados. No entanto, a miltefosina não elimina completamente o parasito do organismo infectado, mas consegue reduzir a carga parasitária (OLIVA et al., 2010).

Outro medicamento utilizado em conjunto ou em monoterapia, é o alopurinol que apresenta atividade leishmaniosstática. O alopurinol é um análogo da hipoxantina que inibe a atividade da xantina oxidase, uma enzima que catalisa a produção de xantina a partir da hipoxantina e ácido úrico a partir da xantina (OLIVA et al., 2010). Sua atividade leishmaniosstática ocorre pois age interferindo na síntese proteica do parasito, uma vez que é agrupado no lugar do ATP durante a síntese de RNA e sua administração a longo prazo mantém baixas cargas de parasitos, contribuindo assim para controle clínico da doença (ARTACHO, 2009; GONÇALVES et al., 2019). A duração do tratamento com alopurinol depende da gravidade da doença, da resposta clínica e parasitológica ao tratamento e da tolerância individual a droga (Tabela 2) (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Quando administrado pelo período mínimo de 2 a 3 meses, observa-se moderada melhora clínica e melhora parcial dos exames laboratoriais. O tratamento com alopurinol tem boa indicação em cães proteinúricos sem insuficiência renal, uma vez que ele parece retardar a progressão da doença renal (OLIVA et al., 2010). No Brasil há restrição na prescrição do alopurinol para o tratamento da LVC uma vez que é proibido o tratamento de cães infectados ou doentes com drogas de uso produtos não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2008).

A associação de antimoniato de meglumina e alopurinol é o protocolo de primeira escolha para o tratamento em cães na Europa (MANNA et al., 2015), não proporciona a cura parasitológica, mas os cães apresentam um período mais longo de remissão clínica quando comparado a monoterapia com qualquer um dos fármacos (OLIVA et al., 2010). O antimoniato de meglumina (Glucantime®) é uma droga que inibe a glicólise e a oxidação de ácidos graxos. Com eficácia de 94% a 95% de cura clínica e parasitológica no tratamento em humanos. Possui meia-vida curta em cães: 21 minutos quando a administração é endovenosa, 42 minutos se administrado por via intramuscular e 122 minutos quando administrado por via subcutânea e após 6 a 9 horas é eliminado pelos rins (OLIVA et al., 2010).

Nos cães é frequentemente usada em associação com alopurinol durante as primeiras quatro semanas de tratamento, demonstrando boa eficácia clínica (Tabela 2) (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022). Durante o tratamento a melhora clínica e clínico-patológica é observada nas primeiras semanas, mas a melhora completa das anormalidades laboratoriais é lenta e dependente da dose prescrita (OLIVA et al., 2010). No entanto, no Brasil há restrição no seu uso para o tratamento da LVC uma vez que é proibido o tratamento de cães infectados ou doentes com drogas de uso humano ou produtos não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2008). Recidivas clínicas após tratamento com antimoniato de meglumina podem ocorrer de meses a 1 ou 2 anos após o tratamento e são mais corriqueiras quando o protocolo instituído é inferior há 4 semanas (OLIVA et al., 2010).

A monoterapia com antimoniato de meglumina ou miltefosina não demonstrou produzir supressão consistente de carga parasitária em cães a longo prazo e pode resultar em recidiva da doença em 6 meses a 1 ano (MANNA et al., 2008; BANETH; SOLANO-GALLEGO et al., 2022). A miltefosina tem sido sugerida para o tratamento em cães com LV em combinação com alopurinol (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Em estudo de curta duração, Dias et al. (2020) observaram que houve melhora clínica em cães tratados em monoterapia com miltefosina e em associação com alopurinol, no entanto no grupo tratado com a associação houve também melhora no escore clínico patológico.

Tabela 1 - Principais drogas, dose, tempo de tratamento e efeitos colaterais para tratamento da leishmaniose visceral canina.

Droga	Dose	Tempo tratamento	Efeitos colaterais
Miltefosina	2 mg/kg/SID q 24 horas por via oral	Durante 28 dias, repetir novo ciclo após 04 meses, caso haja indicação	Vômito e diarreia (autolimitantes)
Alopurinol	10 mg/kg/ q 12 horas por via oral	06 a 12 meses, se houver necessidade	Urolitíase de xantina

pode ser utilizado por maior período			
Antimoniato de meglumina	100 mg/kg/ q 24 horas por via subcutânea	28 dias	Dor e edema no local da aplicação. Febre, diarreia e perda de apetite também são descritas

Outra droga descrita como possibilidade de tratamento para LVC é a Anfotericina B. Sua eficácia é explicada pela interação com esteróis à base de ergostano do protozoário. Possui boa eficácia, porém está associada a graves efeitos adversos que incluem o comprometimento da função renal, vômitos, anorexia e febre. É droga de primeira escolha para tratamento LV em humanos com eficácia de 97% de cura parasitológica no homem. A Organização Mundial da Saúde não recomenda o tratamento em cães com anfotericina B para evitar ocorrência de cepas resistentes (OLIVA et al., 2010).

A marbofloxacin é uma fluoroquinolona de terceira geração desenvolvida para uso veterinário. Seu mecanismo de ação é através da inibição da enzima bacteriana DNA girase. *L. infantum* possui estrutura genômica semelhante com a das bactérias, desse modo a marbofloxacin possui atividade leishmanicida. A dose recomendada é 2 mg/kg a cada 24 horas durante 28 dias (OLIVA et al., 2010). Por fim, a domperidona é um antagonista do receptor D2 de dopamina com atividade pró-cinética e antiemética. Seu efeito antidopaminérgico gera a liberação de serotonina, que estimula a produção de prolactina. A prolactina é uma citocina oriunda de linfócitos pró-inflamatórios (OLIVA et al., 2010) desse modo possui ação imunomoduladora. A dose recomendada é 0,5 – 1 mg/kg a cada 12 horas durante 30 dias (BRASILEISH, 2018).

Tabela 2 - Tratamentos recomendados pelo Leisvet (2011) e Brasileish (2018) de acordo com cada estágio clínico para cães com leishmaniose visceral canina.

Estádio clínico	Tratamento Leisvet	Tratamento Brasileish
I	Alopurinol, Antimoniato de meglumina, Miltefosina Alopurinol em associação com antimoniato de meglumina, Alopurinol em associação com miltefosina	Imunomodulação, Imunoterapia. No Brasil não há mais disponibilidade de vacina (BRASIL, 2023)
II	Alopurinol, Alupurinol com antimoniato de meglumina. Seguir as orientações da IRIS para manejo e tratamento da DRC	Imunomodulação, imunoterapia, alopurinol e miltefosina
III	Alopurinol, Alupurinol com antimoniato de meglumina. Seguir as orientações da IRIS para manejo e tratamento da DRC	Imunomodulação, Imunoterapia, Alopurinol, Miltefosina. Seguir as diretrizes da IRIS para manejo da DRC e controle da pressão sanguínea sistêmica
IV	Recomendado o tratamento	Imunomodulação, Imunoterapia, Alopurinol,

	somente com alopurinol. Seguir as diretrizes IRIS para manejo e tratamento da DRC	Miltefosina. Seguir as diretrizes da IRIS para manejo da DRC e controle da pressão sanguínea sistêmica
V		Imunomodulação, Imunoterapia, Alopurinol, Miltefosina. Seguir as diretrizes da IRIS para manejo da DRC e controle da pressão sanguínea sistêmica

O acompanhamento durante o tratamento da LVC é pautado no quadro clínico do cão doente. Cães estáveis, sem acometimento renal podem ser monitorados um mês após início do tratamento com: exame físico, hemograma, bioquímica sérica e urinálise, caso continue estável os exames devem ser repetidos a cada 3 ou 4 meses durante o primeiro ano de tratamento. É recomendado repetir a sorologia quantitativa de 3 a 6 meses após o início do tratamento, continuando a cada 6 ou 12 meses. Um aumento repentino nos títulos de anticorpos em cães durante ou após tratamento podem indicar nova recidiva da doença (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022). É indicado também monitorar a carga parasitária um mês após o início do tratamento e se a carga parasitária diminuiu o tratamento está sendo eficaz, novo monitoramento deve ser feito no final do tratamento de 6 a 12 meses de acordo com protocolo terapêutico (MARTÍNEZ et al., 2011).

O tratamento a longo prazo da LVC é considerado satisfatório e pode ser interrompido em três condições:

1. Desaparecimento dos sinais clínicos
2. Normalização da hematologia, perfil bioquímico sanguíneo e urinálise
3. Diminuição dos títulos de anticorpos para abaixo do valor de corte (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

2.11 Prevenção

O controle e prevenção da LVC depende de uma abordagem integrada. A transmissão de *L. infantum* pode ser reduzida através do uso de inseticidas que previnem e repelem picadas dos flebotomíneos. Sabe-se que o uso de inseticidas tópicos contendo piretróides sintéticos, permetrina ou deltametrina em sua composição, seja na forma de coleiras ou formulações *spot-on* e *sprays* reduzem efetivamente a transmissão e hoje é considerado o meio mais eficaz de proteger os cães contra a infecção devido sua ação e efeito repelente contra os flebotomíneos (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022; BRASIL, 2006; LEITE et al., 2018).

Outras medidas úteis na prevenção da LVC incluem:

1. Manter o cão dentro de casa do anoitecer ao amanhecer
2. Evitar passeios em horários do entardecer/noite (horário de maior frequência do vetor)
3. Reduzir microambientes favoráveis a flebotomíneos como pilhas de madeira próximos ao domicílio ou perto de onde o cão passa maior tempo
4. Telar os canis, janelas e portas
5. Uso de inseticidas no ambiente interno
6. Veterinários devem orientar os tutores de cães a seguir rigorosamente as recomendações do rótulo do produto escolhido para repelente atendendo-se ao período de troca em caso da coleira e a frequência de administração no caso dos *spot-on* e *sprays*, educando o cliente para o uso correto dos inseticidas
7. Triagem anual de cães que vivem em áreas endêmicas é recomendada
8. Triagem de animais doadores de sangue bem como a exclusão de cães infectados de programas de doação de sangue
9. Com a possibilidade de transmissão pelo coito e transplacentária, ao cão infectado não deve ser permitida a reprodução (BRASILEISH, 2018; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

As vacinas comerciais contra LVC foram aprovadas para proteção de cães em alguns países da Europa e no Brasil. A vacinação diminui a probabilidade de desenvolvimento clínico de LV em cães, mas não tem boa eficácia na prevenção da doença, além disso, está indicada somente para cães assintomáticos, com

resultados sorológicos não reagentes (BRASIL, 2022). Na Europa a Letifend® é uma vacina recombinante de uma proteína quimérica (proteína Q) formada por 5 fragmentos antigênicos de *L. infantum* sem adjuvantes (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022). No Brasil, a LeishTec® possui uma proteína recombinante A2 de *Leishmania donovani* com adjuvante saponina (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022), mas deixou de ser comercializada em maio de 2023 (BRASIL, 2023).

Importante destacar que a imunização não deve ser vista como único mecanismo da prevenção da LVC e que o uso da coleira repelente é indicado também para o cão vacinado. Não existem estudos que evidenciam a eficácia da vacina para LV em humanos (BRASIL, 2022). Os tutores de cães infectados sadios e/ou doentes devem escolher entre manejo/acompanhamento e tratamento ou a eutanásia. Se a escolha for a eutanásia, o procedimento deve ser realizado por um médico veterinário pautada por princípios éticos que evitem o sofrimento animal (BRASILEISH, 2018).

No que diz respeito a prevenção da LV em humanos, as medidas recomendadas pelo Ministério da Saúde têm por objetivo reduzir o grau de morbidade e a taxa de letalidade decorrente do diagnóstico e tratamento precoce da LV. Através do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), cuja vigilância epidemiológica faz parte, buscando ações que visam, principalmente: identificação de áreas de risco para transmissão da LV, identificação do vetor, bem como monitoramento da sua distribuição e dispersão, possibilitar condições para que os profissionais da saúde possam efetuar o diagnóstico e tratamento precoce de casos de LV, investigar óbitos de casos suspeitos de LV, indicar ações de prevenção de acordo com a situação epidemiológica e monitorar efeitos adversos aos medicamentos (BRASIL, 2006).

Dentre as medidas preventivas direcionadas ao homem para evitar risco de transmissão estão:

1. Uso de mosquiteiros, telar portas e janelas, uso de repelentes e evitar locais que o vetor possa habitar/ser encontrado durante entardecer/noite
2. O Ministério da Saúde recomenda também o uso de inseticidas (nas paredes do domicílio e no abrigo dos animais) nas regiões com intensa, moderada ou em surto de LV

3. Saneamento ambiental por meio do manejo ambiental como a limpeza de quintal, terrenos e praças públicas com o objetivo de modificar as condições do meio inviabilizando a formação de ambientes propícios para desenvolvimento de formas imaturas do vetor, bem como a limpeza urbana com a eliminação e o correto destino de resíduos sólidos orgânicos, remoção de fontes de umidade
4. Limpeza periódica dos quintais a fim de evitar acúmulo de matéria orgânica em decomposição: folhas, frutos, fezes de animais que podem favorecer a umidade do solo criando um ambiente propício para o desenvolvimento do vetor
5. Destino apropriado do lixo orgânico, a fim de prevenir o desenvolvimento das formas imaturas do vetor (BRASIL, 2006; BRASIL, 2022).

Embora o tratamento em cães seja aprovado no Brasil, o Ministério da Saúde ainda recomenda a eutanásia de cães soro reagentes como medida de controle sob os seguintes argumentos: o tratamento não induz a cura parasitológica e não impede casos de recidivas dos sinais clínicos, tem efeito limitado na infectividade do vetor e existe risco da seleção de cepas resistentes às drogas reservadas para tratamento em humanos (BRASIL, 2006). No entanto, Dantas-Torres et al 2019b, demonstrou que não houve diminuição da infecção doença em cães ou em humanos.

3. Material e métodos

3.1 Procedimento Ético

Os procedimentos que foram realizados neste estudo foram elaborados de acordo com princípios éticos e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMT) sob o número 23108.062027/2022-15.

Os tutores de cada cão antes da inclusão no estudo foram esclarecimentos sobre os critérios e procedimentos e assinaram o termo de consentimento.

3.2 Desenho do estudo

Desde agosto de 2022 a outubro de 2023, 50 cães naturalmente infectados com *L. infantum*, previamente diagnosticados no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET – UFMT) *campus* Cuiabá ou pela Unidade de Vigilância em Zoonoses de Cuiabá (UVZ), foram avaliados e destes, 17 atenderam aos critérios pra inclusão neste estudo.

Os critérios de inclusão foram: cães de qualquer raça e sexo, acima de seis meses de idade, com sinais clínicos e/ou alterações laboratoriais sugestivas de LVC, com formas amastigotas no exame parasitológico de medula óssea ou linfonodo, ou reagente na sorologia para *L. infantum*. Os cães em fase de gestação/lactação durante o tratamento ou com histórico de tratamento prévio para LVC ou em uso de medicamentos anti-inflamatórios foram excluídos do estudo.

O protocolo terapêutico instituído foi:

- Miltefosina 2 mg/kg (Milteforan®, Virbac), por via oral, uma vez ao dia, por 28 dias consecutivos em associação ao alopurinol 10 mg/kg, por via oral, duas vezes ao dia, por cinco meses consecutivos (150 dias) (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).
- Para todos os cães participantes no estudo foi prescrito coleira repelente impregnada com deltrametrina ou flumetrina conforme Leite et al. (2018), de uso contínuo.

O tratamento foi realizado em domicílio pelos tutores com agendamento da consulta/retorno para a avaliação clínica e coleta de amostras (Figura 6).

3.3 Avaliação clínica

Os cães foram examinados nos dias D0 (antes do tratamento) e D150 (após 150 dias de tratamento) e registrados: os sinais clínicos, achados laboratoriais e escore clínico (Figuras 6 e 7). O escore clínico (Quadro 6) foi avaliado e a gravidade dos sinais clínicos atribuídos à infecção foi pontuada em uma escala de 0 a 3 (0 ausência de sinal clínico, 2 moderado sinal clínico e 3 sinal clínico grave), podendo então, totalizar até 84 pontos (PROVERBIO et al., 2014a com adaptações). E imagens foram anexadas nos prontuários para acompanhamento.

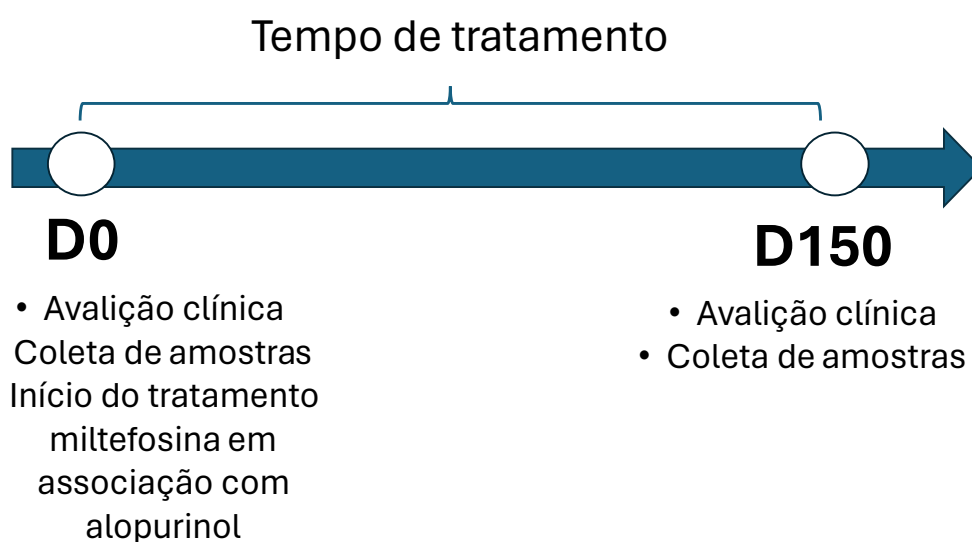


Figura 6 – Tempo de tratamento 150 dias. D0: valiação clínica, coletas de amostras e início do tratamento com miltefosina e alopurinol. D150: retorno para nova avaliação clínica e coletas de amostras.

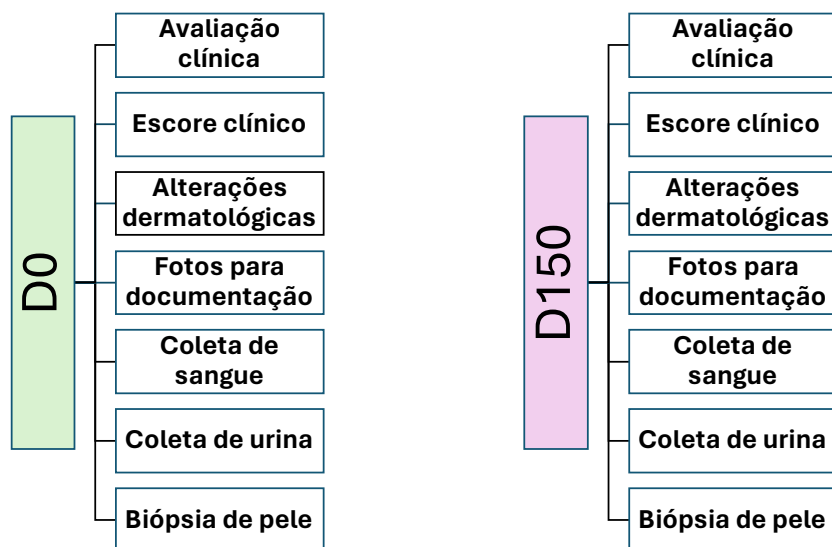


Figura 7 – Descrição dos procedimentos realizados nos dois tempos de tratamento nos cães com leishmaniose visceral em tratamento com miltefosina em associação com alopurinol.

Tabela 3 – Parâmetros para avaliação do escore clínico em cães com LVC.

Sinal clínico	0	1	2	3
Apetite	Não	Ligeira diminuição	Diminuição moderada	Anorexia
Estado mental	Não	Leve depressão	Depressão	Prostração
Emagrecimento	Não	Leve	Moderado	Severo
Letargia	Não	Leve	Moderada	Acentuada
Poliúria	Não	Leve	Moderada	Severa
Polidipsia	Não	Leve	Moderada	Severa
Atrofia muscular localizada (músculo temporal)	Não	Leve	Moderada	Severa
Atrofia muscular generalizada	Não	Leve	Moderada	Acentuada
Linfadenomegalia	Não	Leve	Moderada	Acentuada
Esplenomegalia	Não		Sim	
Conjuntiva e/ou blefarite	Não	Unilateral leve	Unilateral ou bilateral severa	Bilateral severa

Uveíte e/ou ceratite	Não	Unilateral leve	Unilateral ou bilateral severa	Bilateral severa
Palidez de mucosa	Não	Leve	Moderada	Severa
Epistaxe	Ausente	Esporádico	Moderado	Severo
Úlcera/nódulo mucocutâneas	Não	1 ou 2 úlceras pequenas ou nódulos	>2 úlceras ou nódulos	Presença de úlceras ou nódulos em >1/4 cavidade oral
Vômito	Não	Esporádico	Frequente	Frequente com sangue
Diarreia	Não	Esporádico	Frequente	Persistente
Claudicação	Não	Esporádico	Frequente	Constante
Eritrema	Não	<10% da superfície corporal	10-25% superfície corporal (moderado)	>25% da superfície corporal
Dermatite esfoliativa	Não	<10% da superfície corporal	10-25% superfície corporal (moderado)	>25% da superfície corporal
Dermatite ulcerativa	Não	1-2 úlceras	3-5 úlceras	>5 úlceras
Dermatite nodular	Não	1-2 nódulos	3-5 nódulos	>5 nódulos
Dermatite pustular	Não	1-2 pústulas	3-5 pústulas	>5 pústulas
Alopecia	Não	<10% da Superfície corporal	10-25% Superfície corporal	>25% da Superfície corporal
Alteração na pigmentação	Não	Localizada	Multifocal	Generalizada
Hiperqueratose de nasodigital	Não	Leve	Moderada	Generalizada
Hiperqueratose generalizada	Não	Leve	Moderada	Severa
Onicogribose	Não	Leve	Moderada	Severa

Nota 0, sinal clínico não está presente

Nota 1, para sinal leve

Nota 2, para sinal moderado

Nota 3, para sinal grave

Adaptado de Proverbio et al. (2014a)

3.4 Análise hematológica, bioquímica e urinária

Amostras sanguíneas foram coletadas nos mesmos dias em que foram monitorados o escore clínico (D0 e D150) por venopunção jugular externa ou cefálica, e acondicionadas em tubo contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para realização do hemograma e em tubo sem anticoagulante para extração do soro para avaliação da bioquímica sérica. O hemograma completo foi realizado pelo Analisador Hematológico Poche 100 (Roche®) automatizado, com posterior conferência de esfregaço sanguíneo em microscopia de luz (JAIN, 1993), enquanto a bioquímica sérica foi realizada com kits comerciais no Analisador Bioquímico Automatizado Wiener® (KANEKO, 2008). A relação albumina/globulina foi obtida através da divisão da concentração de albumina pela globulina sérica.

A amostra de urina foi processada até uma hora após a coleta por micção natural ou cistocentese. Primeiramente foi realizada a avaliação física da amostra observando cor, odor e aspecto. Em seguida foi realizada a densidade urinária específica por refratometria e o exame químico na fita do kit Combur test® (pH, glicose, corpos cetônicos, proteínas, bilirrubina, sangue oculto) e então a urina foi centrifugada. Após centrifugar, o sobrenadante foi descartado, restando apenas 0,5 ml para sedimentocopia e determinação da relação proteína: creatinina na urina (UPC), calculada pela divisão da concentração de proteína pela concentração de creatinina urinária.

3.5 Biópsia, exame histopatológico de pele e Imuno-histoquímica

A biópsia de pele foi realizada de forma padronizada na região pré-escapular, após anestesia local subcutânea com lidocaína 2% sem vasoconstritor nos dias D0 (antes do tratamento) e D150 (após 150 dias de tratamento). Foram coletados quatro fragmentos de pele hirsuta utilizando *punch* (GASPARETTO et al., 2018) de 5 mm, dois para exame histopatológico, e dois para teste molecular.

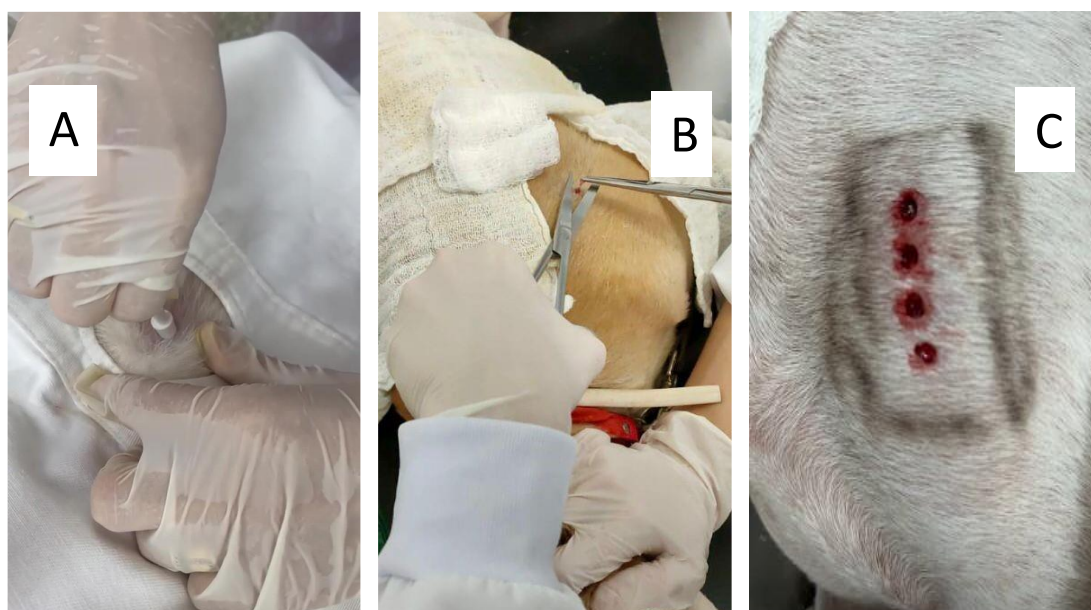


Figura 8 – (A, B e C) Biópsia de pele realizada em pele hirsuta (íntegra ou com presença de lesão) em região pré-escapular em todos os cães com *punch* de 5mm.

Para exame histopatológico, as amostras foram acondicionadas em cassetes e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% e processadas rotineiramente, incluídas na parafina, cortadas a 5µm de espessura e coradas pela hematoxilina-eosina (HE) (PROPHET et al., 1992). A análise histopatológica foi realizada por um avaliador e as alterações referentes à epiderme, derme, folículos pilosos, glândulas sebáceas, infiltrado inflamatório (discreto, leve, moderado, acentuado) e presença de amastigotas foram anotadas e agrupadas em ficha histopatológica padronizada e individualizada.

A imuno-histoquímica, foi realizada conforme descrito por Oliveira (2017), com modificações. Resumidamente, os cortes foram desparafinados em banho com xilol por 10 minutos por duas vezes. Em seguida os cortes foram submersos em concentração decrescente de álcool (álcool 100%, álcool 96%, álcool 80% e álcool 70%) para serem hidratados durante 2 minutos em cada solução e então enxaguadas em água destilada por 5 minutos. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos. Para recuperação antigênica foi usado Tampão Citrato pH 6 em banho-maria no micro-ondas em potência máxima por 3 minutos, aguardando 10 minutos em temperatura ambiente para esfriar. Em seguida, foi realizado bloqueio das reações inespecíficas com leite Molico® diluído em água destilada a 5% por 30

minutos. As secções foram incubadas com anticorpo primário policlonal anti-*Leishmania amazonensis*, produzido pela Escola de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), diluídos a 1:1000 em PBS; *overnight* por 16 horas a 4° C, em câmara úmida e escura. Para incubação do anticorpo secundário e polímero utilizou-se o KIT MACH 4 Universal HRP- Polymer da BIOCARE MEDICAL® (Pacheco, CA, EUA) por 20 minutos cada, em câmara úmida e temperatura ambiente. Efetuou-se a revelação da reação com o cromógeno 3,3' Diaminobenzidina (DAB) Dako® durante 10 segundos. Os cortes foram contra corados com hematoxilina por 10 segundos e lavados em água corrente por 1-2 minutos. Em seguida, submersos para desidratação em concentração crescente de álcool (álcool 80%, álcool 96%, álcool 100%) por 2 minutos cada, seguida de dois banhos em xilol e realizado a montagem das lâminas. Entre cada etapa, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 acrescida de Tween 20 e enxaguadas em água destilada, durante 5 minutos cada lavagem.

3.6 Extração de DNA e qPCR

As amostras de pele, aproximadamente 25 miligramas, foram processadas para extração de DNA pelo método fenol clorofórmio conforme descrito por Sambrook e Russell (2006). Resumidamente, as amostras foram colocadas em tampão de lise contendo 10mM Tris-HCl, pH 8.0; 25mM EDTA; 100mM NaCl; 0.5% SDS e 100µg/ml de proteinase K, incubadas a 56°C, até completa lise celular. Após lavagem com etanol 70%, por 10 minutos, a 10,000g, o DNA foi ressuspendido em água ultrapura. Para averiguar a integridade do DNA as amostras foram testadas para gene endógeno globina β -globina canina (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3' e 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC - 3'), que foi utilizado como um controle de amplificação (QUARESMA et al., 2009).

A q-PCR foi realizada utilizando os primers RV1- 5'-CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G-3' e RV2 - 5'- CCA CCT GGC TAT TTT ACA CCA-3' que amplificam uma sequência de 145pb, específica de *L. infantum* (kDNA) (LACHAUD et al., 2002). O programa consistiu de: 10 min a 94°C; 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 30 segundos a 72° C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Uma curva padrão foi estabelecida para cada ensaio utilizando quantidades conhecidas de plasmídeo (TOPO PCR 2.1 (Invitrogen

Corp®) contendo o gene kDNA de *L. infantum*. Uma série de diluições contendo 2×10^4 a 2×10^8 cópias do plasmídeo recombinante foram realizadas a fim de estabelecer a curva padrão. Foi utilizado controle negativo contendo água sem DNA em todas as reações (AYRES et al., 2022).

3.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa R. Os dados foram tabulados em planilhas no Microsoft® Excel®. As variáveis quantitativas foram testadas com teste t pareado com tamanho de efeito d de Cohen e intervalo de confiança bootstrap CBa. Todos os procedimentos bootstrap foram realizados com 1000 reamostragens. Nas variáveis qualitativas foi realizado o teste de Stuart-Maxwell para comparar proporções de categorias em dados pareados com mais de duas respostas possíveis, testando a hipótese de igualdade das proporções ao longo do tempo. O valor de p foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

4. Resultados

Todos os cães foram considerados sintomáticos antes do tratamento. Após 150 dias, 70,5% (12/17) persistiam com sinais clínicos, mesmo que mais leves. A média do escore clínico dos cães antes do tratamento foi de 12,47, houve uma redução significativa ($p < 0,001$) para 3,58 (escala de 0 a 87) no D150. Esta redução do escore converge com o ganho de peso ($p = 0,004$) (Figura 9), a redução da carga parasitária e a diminuição da severidade das lesões cutâneas (Figuras 10, 11, 12, 13 e 14).

Dos dezessete cães, nove fêmeas (52,9%) e oito machos (47%), com idade média de 58,18 meses e a mediana de 48 meses, sendo idade mínima 6 meses e a máxima 12 anos. Quanto a raça, 41,17% (7/17) dos cães não tinham raça definida (SRD) e 58,82% (10/17) com raça definida, sendo: dois da raça Dachshund, um American Bully, um Akita, um Pinscher, dois American Pitbull, um Poodle, um Australian Cattle Dog e um Labrador Retriever.

Inicialmente, 76,4% (13/17) cães apresentavam anemia, reduzindo para 29,4% (5/17) após o tratamento, refletindo o aumento significativo nos valores do eritrograma (Tabela 4) após 150 dias. Os valores médios de proteínas totais e glob+ulinas reduziram, enquanto a albumina elevou com diferença estatística significativa antes e após D150 (Figura 9). O mesmo ocorreu nos valores médios de creatinina e alanina aminotransferase, no entanto, todas continuaram dentro dos valores de referência (Tabela 4).

Em D0, 88,2% (15/17) dos cães apresentavam dermatopatias. A dermatite ulcerativa foi uma das alterações mais observadas, vista em 100% (15/15) dos cães. Destes, apenas um cão (6,6%) apresentava distribuição difusa e nos demais cães, as lesões se localizava em membros, ponta de orelhas, lábio, região sacro-ilíaca e/ou mama. Seguida por alopecia/hipotricose em 93,3% (14/15) cães, dermatite esfoliativa 73,3% (11/15), onicogribose 46,6% (7/15), dermatite nodular 26,6% (4/15), hiperqueratose nasodigital 26,6% (4/15) e hiperqueratose generalizada 13,3% (2/15) cães. Dois cães não apresentavam dermatopatia no início do tratamento e permaneceram sem esses sinais até o D150. Após o tratamento (D150), não foram observadas lesões dermatológicas em treze cães (76,4%) no exame dermatológico. Dos quatro cães com dermatopatias, 50% (2/4) cães exibiam dermatite ulcerativa: em um cão continuava localizada na região mamária e no outro na região cervical. Além

disso, havia outras lesões nesses mesmos animais, incluindo: alopecia periocular (1/25%), dermatite esfoliativa, (4/100%) onicogribose (3/75%) e hiperqueratose (3/75%) nasodigital ou no cotovelo (Figuras 10, 11, 12, 13 e 14).

As alterações microscópicas corados com HE foram visualizadas nos 17 (100%) cães em algum tempo do tratamento (D0 ou D150). Em D0, 14 cães apresentavam lesões microscópicas e em D150, 16 cães. Nos dois cães que não tinham sinais clínicos cutâneos em D0, observou-se lesões microscópicas em D0 e D150. Em D0, um apresentava hiperqueratose ortoqueratótica leve. Em D150, o mesmo cão continuou com hiperqueratose ortoqueratótica leve e, os dois apresentaram discreta inflamação em derme composta por macrófagos. Quanto a localização da inflamação, em um dos cães era multifocal e no outro perivascular. Em um deles também foi observado paniculite com infiltrado inflamatório lobular com macrófagos e plasmócitos.

Em D0, 14 (82,4%) apresentavam hiperqueratose ortoqueratótica de leve (12/70,6%) a moderada (2/11,8%) na epiderme. Em um (5,9%) cão foi observado crosta focal. Na derme foi observado infiltrado inflamatório em 13 (76,5%) dos cães, predominantemente mononuclear (11/64,7%) seguido por misto (2/11,8%) com intensidade moderada/acentuada em 7 (41,2%) cães e leve /discreta em 6 (35,3%) cães. O macrófago, célula predominante observado em 100% dos cães com inflamação, seguido de plasmócito, neutrófilos e linfócitos. O padrão inflamatório observado variou de perivascular, perianexal e intersticial principalmente em derme superficial e apenas um cão apresentou distribuição difusa (Figura 15). Em 7 (41,2%) cães observou-se paniculite.

Em D150, 16 (94,1%) cães apresentavam hiperqueratose ortoqueratótica classificada como leve. Um cão apresentou acantose em D150, classificada como moderada, não observada antes do tratamento. A inflamação em derme persistiu no D150, vista em 14 (82,4%) dos cães, mas com redução na intensidade da inflamação, visto que em 13 (76,5%) cães na forma leve/discreta e em 1 (5,9%) cão, moderada (Figura 12). Destes, o infiltrado inflamatório mononuclear nos 14 (82,4%) dos cães. O padrão inflamatório observado variou de perivascular, perianexal e intersticial principalmente em derme superficial. Houve melhora também da paniculite observada apenas em 3 (17,3%) dos cães após o tratamento.

As amastigotas foram observadas em seis (35,3%) cães nas amostras de pele coradas com HE no D0 (Figura 15), e no D150, apenas em um (5,9%) cão observou-se amastigota, reduzindo significativamente o número de cães com amastigotas ($p=0,025$). Enquanto, na imuno-histoquímica em D0, em 9/17 (52,9%) cães foram observadas amastigotas, enquanto em D150 foi observado marcação positiva em 5/17 (29,9%) dos cães (Figuras 16 e 17).

Pela qPCR da pele, em todos os cães antes do tratamento foi detectado o DNA de *Leishmania infantum* e após, em 16 cães (D150). Neste período houve redução significativa ($p = 0,008$) dos valores médios da carga parasitária cutânea, no entanto, em três cães se observou aumento da carga parasitária mesmo com o tratamento.

Tabela 4 - Valores da média dos parâmetros hematológicos, bioquímicos, urinários e carga parasitária dos cães antes (D0) e após (D150) o tratamento com miltefosina e alopurinol

Variáveis (Intervalo de referência)	D0	D150	Valor p
Eritrócitos ($5.5-8.5 \times 10^6/\mu\text{L}$)	4,80	6,02	<0,001
Hemoglobina (12-18 g/dL)	9,91	13,16	0,002
Hematócrito (37-55%)	31,70	40,23	0,004
Leucócitos Totais ($6-17 \times 10^3/\mu\text{L}$)	7,94	8,1	0,938
Plaquetas ($200-500 \times 10^3/\mu\text{L}$)	203,35	247	0,526
Ureia (21 – 59,9)	41,58	50,64	0,230
Creatinina (0,5 – 1,5 mg/dL)	0,94	1,14	0,012
PT (5,4-7,1 g/dL)	9,65	8,42	0,012
Albumina (2,6 – 3,3)	2,37	3,01	0,004
Globulina (2,7 – 4,4)	7,28	5,41	0,006
ALT (21 – 102)	38,05	60,64	<0,001
FA (20 – 156)	113,11	69,47	0,004
Densidade urinária (1015 – 1045)	1030,82	1035,94	0,210
UPC (<0,2)	0,982	0,534	0,300
Carga parasitária*	5,767	4,782	0,008

*número de cópias (10^{10})/ μL

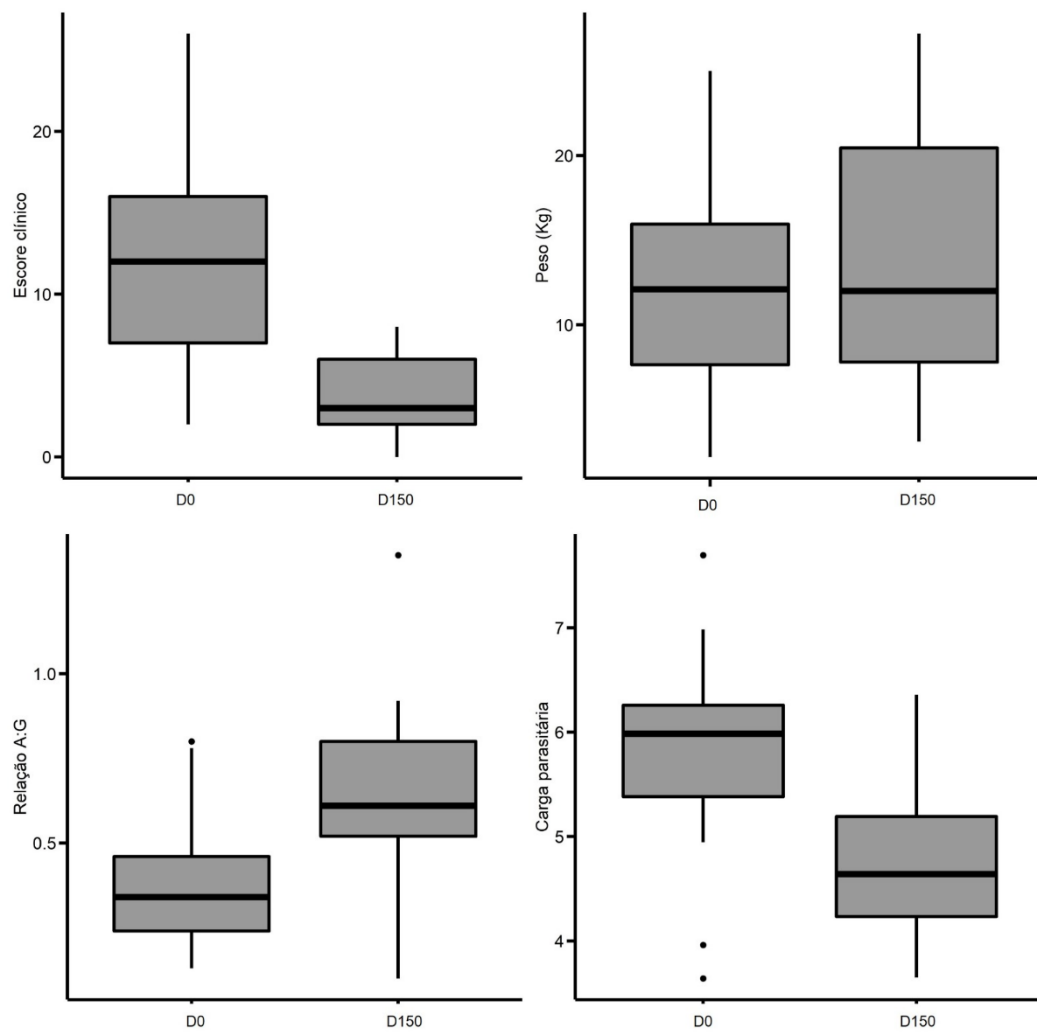


Figura 9 Gráfico Box Plot do escore clínico, peso, relação A:G e carga parasitária (10^{10})/ μ l dos cães com leishmaniose visceral antes (D0) e após (D150) o tratamento com miltefosina e alopurinol



Figura 10 (A) Dermatite ulcerativa em cão, fêmea, 03 anos de idade com leishmaniose visceral antes do tratamento (D0). (B) Remissão do sinal clínico após D150 do tratamento com miltefosina e alopurinol. (C) Dermatite esfoliativa e alopecia em orelha de cão, fêmea, 08 meses de idade antes do tratamento com miltefosina e alopurinol. (D) Remissão do sinal clínico após D150 de tratamento. (E) Dermatite esfoliativa e áreas de hipotricose/alopecia em cão, fêmea, 08 meses de idade antes do tratamento com miltefosina e alopurinol. (F) Redução dos sinais clínicos após D150 de tratamento. (G) Dermatite esfoliativa em membros e face com alopecia periocular e focinho, hipotricose generalizada e onicogrifose em cão, fêmea, 08 meses de idade ao início do tratamento para leishmaniose visceral. (H) Nota-se significativa redução das lesões cutâneas após 150 dias de tratamento.

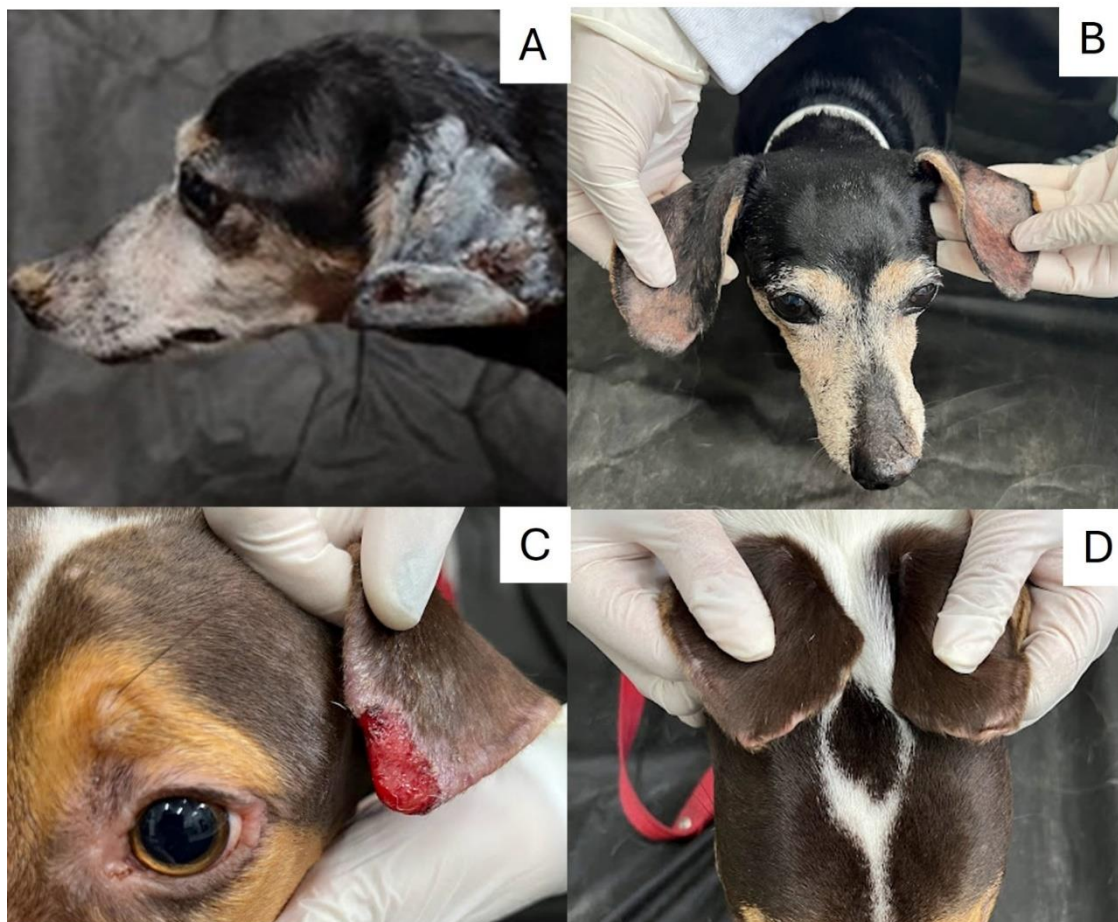


Figura 11 (A) Dermatite ulcerativa em orelha e hiperqueratose em plano nasal de cão, fêmea, 12 anos com leishmaniose visceral, antes do início do tratamento com miltefosina e alopurinol. (B) Remissão da dermatite ulcerativa e melhora da hiperqueratose nasal após 150 dias de tratamento. (C) Dermatite ulcerativa em ponta de orelha e alopecia periocular em cão, macho, 01 ano com leishmaniose visceral ao início do tratamento com miltefosina e alopurinol. (D) Remissão da dermatite ulcerativa após 150 dias de tratamento.



Figura 12 (A e B) Dermatite esfoliativa, alopecia, hipotricose e leve onicogribose em cão, macho, 01 ano de idade ao início do tratamento para leishmaniose visceral. (C) Nota-se remissão das lesões cutâneas após 150 dias de tratamento.



Figura 13 (A e B) Dermatite esfoliativa difusa, hipotricose e onicogribose em cão, fêmea, 08 anos de idade ao início do tratamento para leishmaniose visceral. (C) Nota-se remissão das lesões cutâneas após 150 dias de tratamento.

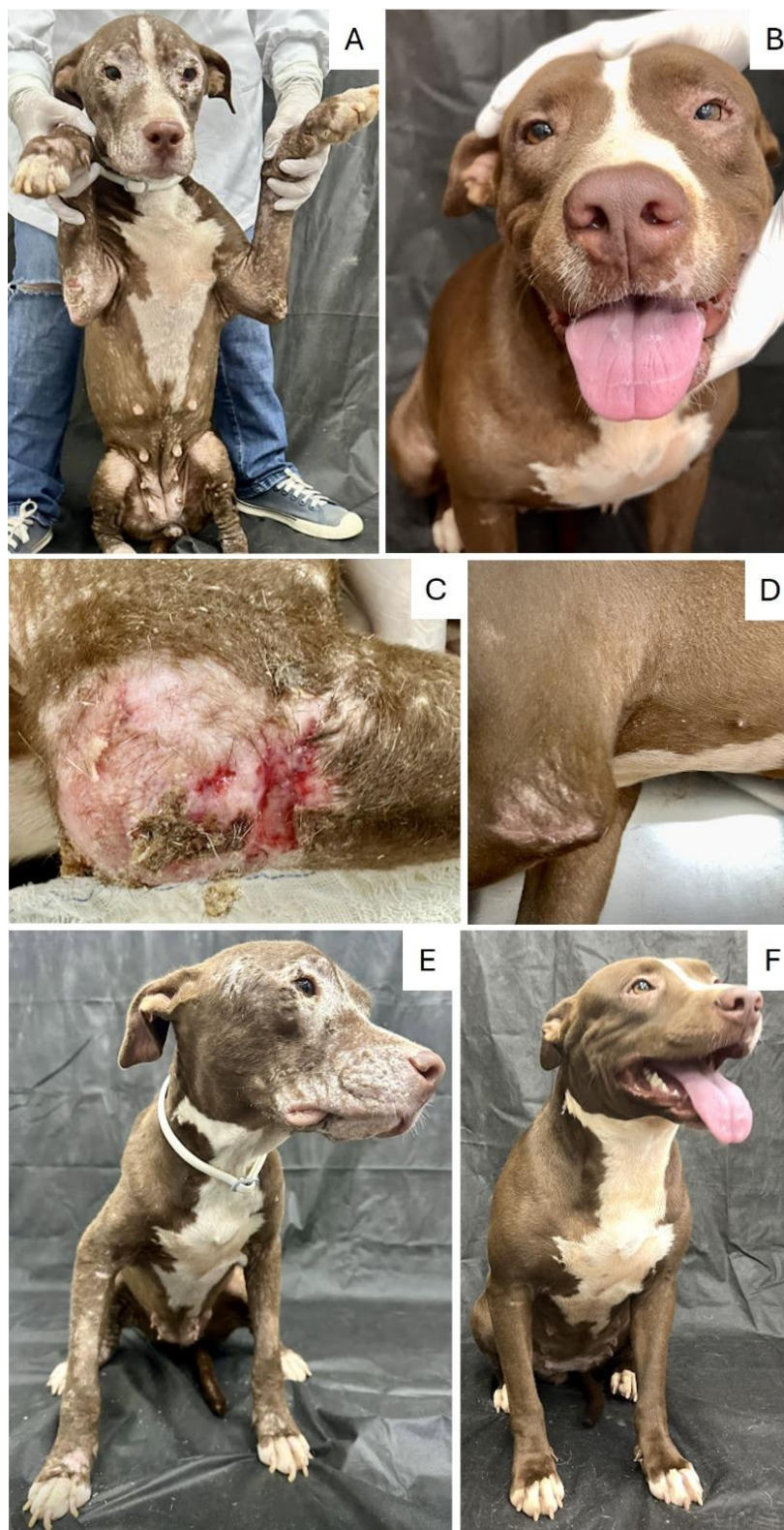


Figura 14 (A e E) Dermatite esfoliativa em membros e face com alopecia periocular e focinho, hipotricose generalizada e onicogrifose em cão, fêmea, 08 meses de idade ao início do tratamento para leishmaniose visceral. (C) Dermatite ulcerativa e dermatite esfoliativa em cotovelo no mesmo cão. (B, D e F) Nota-se significativa redução das lesões cutâneas após 150 dias de tratamento.

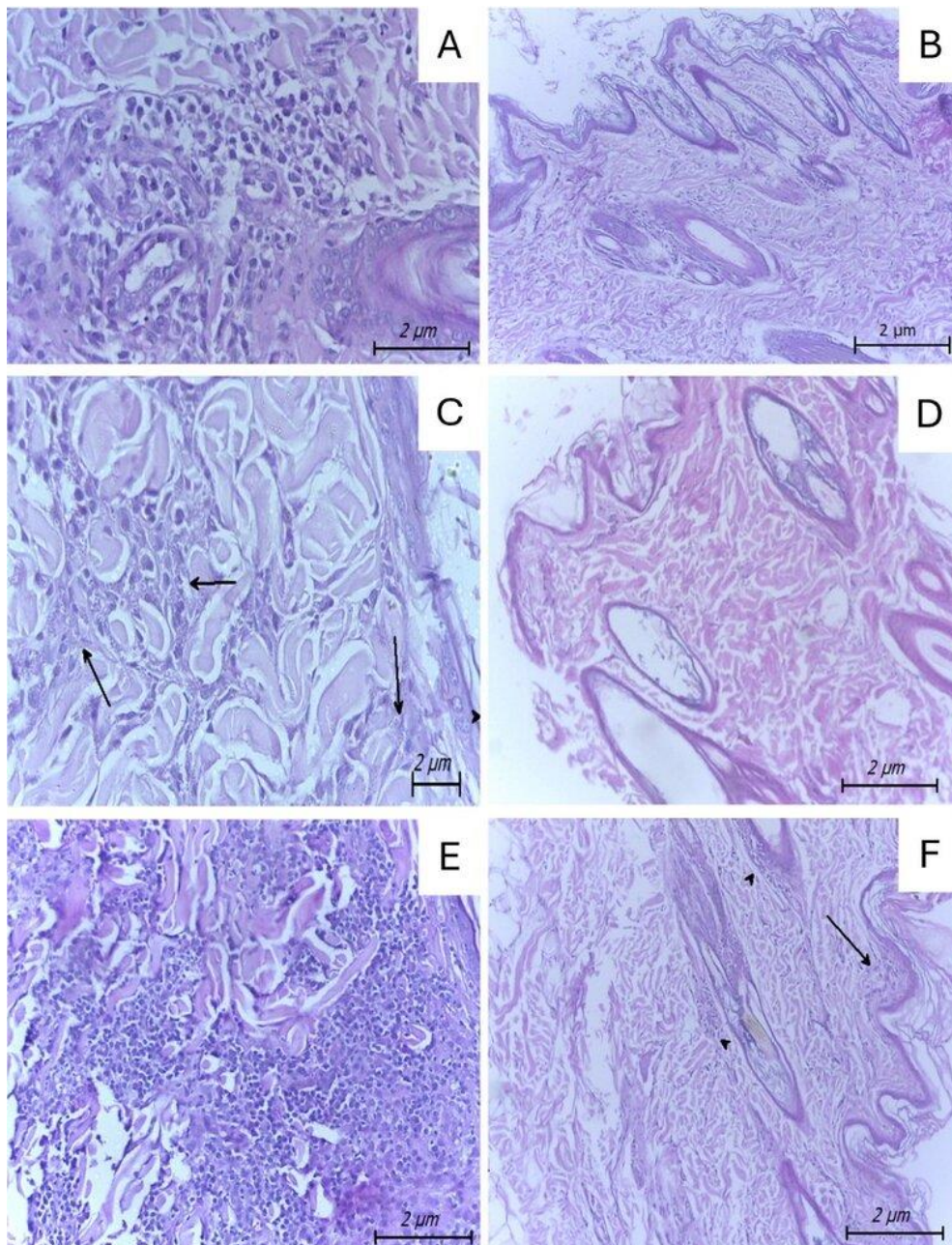


Figura 15 Pele. Infiltrado inflamatório perivascular composto predominantemente por macrófagos em derme de cão com LVC no D0. HE, Obj 40x. (A). Nota-se redução da inflamação 150 dias após o tratamento. HE, Obj 20x. (B). Formas amastigotas de *L. infantum* dispersas no interstício em derme de cão no D0. HE, Obj 40x. (C). Não foi observado presença de amastigotas na pele do mesmo canino com leishmaniose visceral após D150 de tratamento HE, Obj 10x. (D). Acentuado infiltrado inflamatório em interstício composto por macrófagos e linfócitos em cão com LVC no D0. HE, Obj 40x. (E). Leve infiltrado inflamatório composto por macrófagos em derme do mesmo cão (setas). Evidenciando a diminuição da inflamação após 150 dias de tratamento (F). HE, Obj 20x.

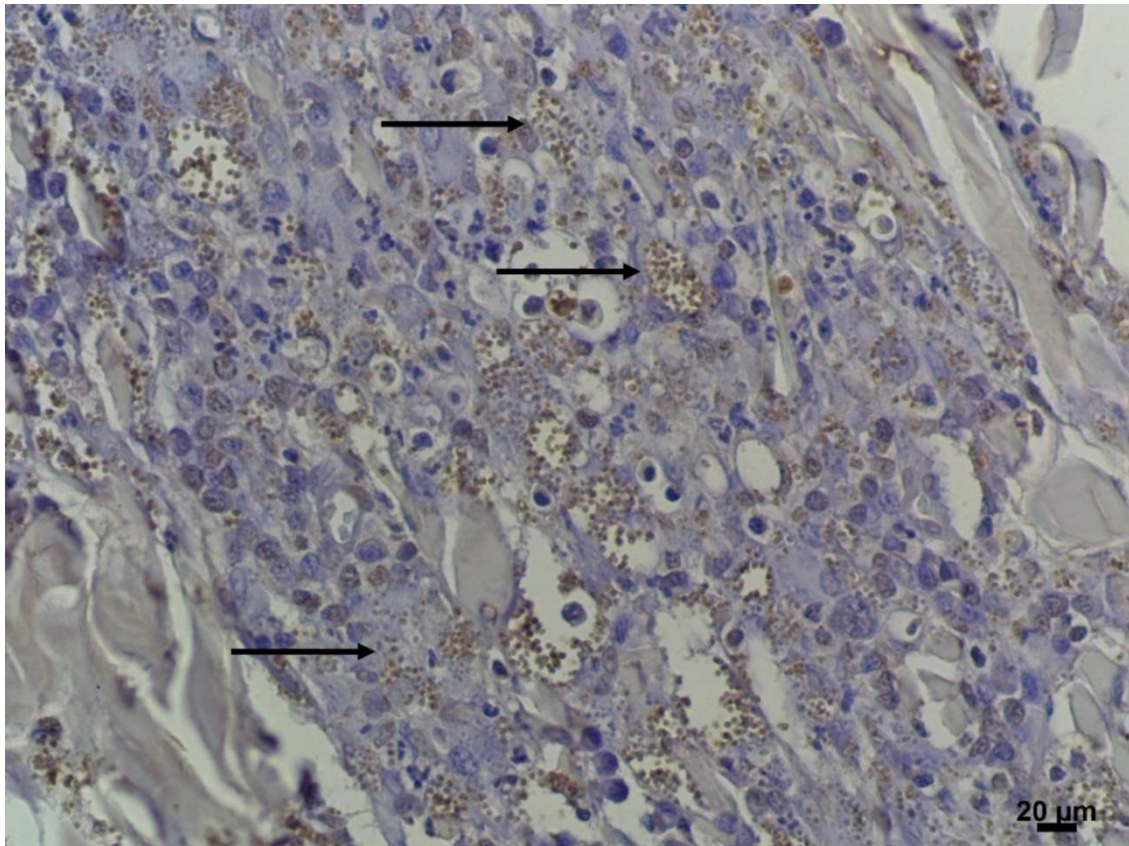


Figura 16 Pele. Imunomarcação de amastigotas ocupando o citoplasma de macrófagos e dispersas no interstício, em cão no D0 (setas). Obj 40x.

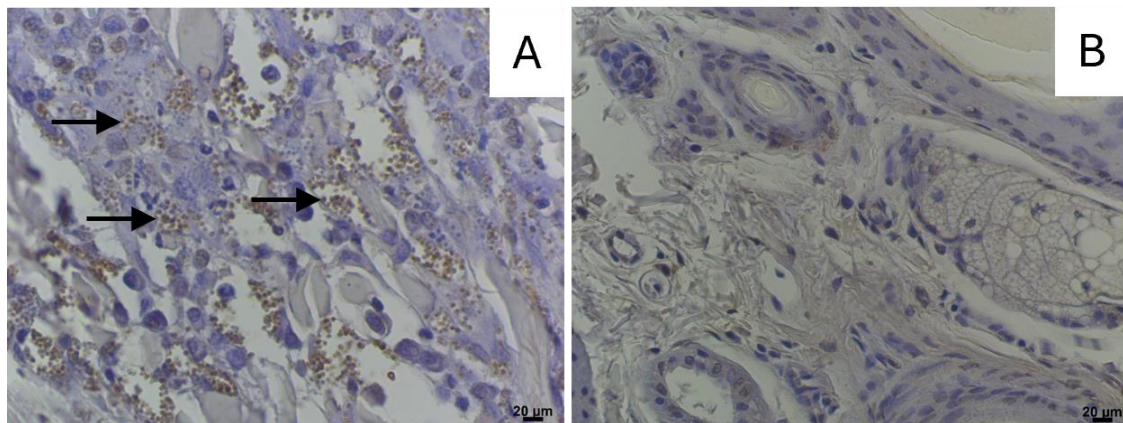


Figura 17 Pele. Imunomarcação de amastigotas em pele de cão em D0 (A). Diminuição das formas amastigotas do mesmo cão em D150 (B). Obj 65x

5. Discussão

Neste estudo, o tratamento dos cães com miltefosina associado ao alopurinol proporcionou a remissão ou redução dos sinais clínico patológicos, incluindo as lesões dermatológicas. Dentre os cães tratados não havia cães das raças citadas como predispostas ao desenvolvimento da doença, Pastor Alemão, Boxer, Cocker Spaniel, Doberman Pinscher e Rottweiler (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). Em relação a faixa etária, os cães desse estudo não se encontravam dentro das faixas etárias mais predispostas, ou seja, abaixo de 3 anos ou acima de 8 anos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). No entanto, como o período de incubação da infecção por *L. infantum* é bastante variável, três a sete meses (BRASIL, 2014), e a evolução clínica é crônica, justificaria essa variação temporal no diagnóstico e início do tratamento.

A redução do escore clínico em todos os cães acompanhados durante os 150 dias de tratamento também foi observado em estudo realizado por Dias et al. (2020) de curta duração (28 dias) com o protocolo terapêutico semelhante, diferindo apenas na dose de alopurinol. Proverbio et al. (2014a) também notaram redução do escore clínico com o mesmo protocolo terapêutico. A melhora das anormalidades clínico-patológicas mostrou que a associação da miltefosina com alopurinol teve boa eficácia clínica, assim como visto por Ayres et al. (2022).

Inicialmente, os cães apresentavam anemia e hiperproteinemia por hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. Esses achados são frequentes e importantes para o monitoramento clínico na LVC (BANETH; SOLANO-GALLEGO 2022; DIAS et al., 2020; SOLANO-GALLEGO et al., 2022). A anemia regrediu após o tratamento e está relacionada a alterações na eritropoiese causando anemia não regenerativa (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022) ou ao aumento da hemólise, devido ao aprisionamento de eritrócitos no baço e no fígado pela resposta inflamatória à infecção por *L. infantum* (ABBEHUSEN et al. 2017). A albumina e a relação albumina/globulina se elevou, e a hiperproteinemia e hiperglobulinemia persistiu, embora tenha reduzido significativamente. A elevação das globulinas depende da resposta imunológica e em associação com alta carga parasitária induz a formação de imunocomplexos (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022) que podem se

depositar em órgãos alvos como rins, olhos e articulações (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014), induzindo a progressão da doença. A diminuição da albumina, que é considerada uma proteína de fase aguda negativa, ocorre em consequência da lesão glomerular e devido a resposta inflamatória que diminui a sua produção no fígado (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022).

Embora tenha se observado o aumento na média dos valores médios de ALT em D150, elas ainda permaneceram dentro dos valores de referência. O mesmo ocorreu com a creatinina, o que pode ser justificado pelo fato de a creatinina ser um biomarcador de lesão renal tardio (NABITY et al., 2015). A densidade urinária e proteinúria não diferiram significativamente, mas houve um aumento na proteinúria após o tratamento, um biomarcador importante na progressão da LVC (BANETH et al., 2018).

Os sinais clínicos cutâneos observados nos cães foram: alopecia/hipotricose, dermatite ulcerativa, dermatite esfoliativa e hiperqueratose nasodigital e estão entre as alterações dermatológicas mais observadas na LVC (ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2011), podendo estar associadas a outros sinais ou anormalidades clínico-patológicas. Neste estudo, apenas dois, dos 17 cães, não apresentaram sinais dermatológicos no D0, corroborando com a descrição de Koutinas e Koutinas (2014), que relataram que as alterações na pele acometem até 90% dos cães doentes e junto com as alterações renais e/ou oculares estão entre as principais queixas dos tutores de cães com LVC. Almeida; Mendonça; Sousa (2010) em estudo realizado em Cuiabá observaram dermatite furfurácea e úlceras cutâneas como as alterações clínicas dermatológicas mais frequentes, assim como Ayres et al. (2022), que notaram úlceras cutâneas, onicogribose e alopecia como as mais observadas. As úlceras cutâneas ocorrem em decorrência da vasculite local ou traumas e se localizam principalmente em ponta de orelha, membros e junções mucocutâneas (KOUTINAS; KOUTINAS 2014), corroborando com dado observados neste estudo, uma vez que a dermatite ulcerativa foi observada nos 15 cães que apresentavam lesões dermatológica.

Na histopatologia, nos dois cães que não apresentaram sinais dermatológicos, microscopicamente observou-se leve hiperqueratose ortoqueratótica em um deles em D0 e discreto infiltrado inflamatório composto por macrófagos em ambos em D150. Da mesma forma, os cães após o

tratamento ainda apresentaram lesões cutâneas histopatológicas, mesmo sem sinais dermatológicos. Koutinas e Koutinas (2014) e Verçosa et al. (2008) observaram lesões microscópicas, como infiltrado inflamatório na pele, mesmo em cães com a pele clinicamente normal (sem sinais clínicos cutâneos), entretanto, relatam maior intensidade na pele dos cães clinicamente acometidos. Nesse estudo, no momento D0, 83,33% cães apresentaram alteração na epiderme descrita como hiperqueratose do tipo ortoqueratótica. A alteração da epiderme como hiperqueratose ortoqueratótica ou paraqueratótica, acantose, crostas e ulcerações são comumente descritas em biópsias de pele de cães infectados (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). A observação somente da hiperqueratose ortoqueratótica pode ser justificada pela metodologia do estudo que padronizou a coleta da região pré-escapular ao invés de coletar diretamente da lesão.

A inflamação da derme foi descrita em 76,5% dos cães com predomínio de macrófagos. Os macrófagos são descritos como células mais importantes desse infiltrado inflamatório constituindo o principal componente celular da resposta inata e neles, são observadas as formas amastigotas do protozoário (PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015). Papadogiannakis et al. (2005), Verçosa et al. (2008) e Ordeix et al. (2017) descreveram na derme a inflamação decorrente da infecção por *L. infantum* pode ser granulomatosa ou piogranulomatosa, com predominância de macrófagos e linfócitos. As lesões de pele são atribuídas a inflamação piogranulomatosa que pode atingir diferentes estruturas da pele e, menos frequente pela deposição de imunocomplexos (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). Após o tratamento, observou-se a diminuição da intensidade da inflamação no exame histopatológico, apesar de persistir em 14 cães. Cardoso et al. (2017) observaram resultado semelhante ao avaliar pele da orelha de cães infectados por *L. infantum* concluindo que a intensidade da reação inflamatória da derme varia de acordo com o quadro clínico, o que pode ser justificado pelo fato que todos os cães atingirem melhora no escore clínico e laboratorial com maior tempo de tratamento.

A diminuição de cães com amastigotas observadas na histopatologia e imuno-histoquímica da pele reforçam os valores médios menores da carga parasitária cutânea na qPCR nos cães tratados com miltefosina e alopurinol. Esta resposta a terapia, reflete nos sinais clínicos, mas pode diminuir a

infectividade para o vetor (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ, CORPAS-LOPEZ, 2022; SANTOS et al., 2019). Ayres et al. (2022) obtiveram resultados semelhantes em cães com LVC após 28 dias de tratamento com miltefosina em associação alopurinol. Após o tratamento, três cães apresentaram aumento da carga parasitária, apesar da redução dos sinais clinicopatológicos, fato que pode estar relacionado a própria técnica da qPCR, apesar de ser o teste padrão ouro para quantificar a carga parasitária em tecidos de cães infectados (MANNA et al., 2008) e pode ser usada para o diagnóstico, mas também no acompanhamento do tratamento (CHAGAS et al., 2021; MARTÍNEZ et al., 2011). Entretanto, este achado alerta para a falhas na resposta a terapia: seja por erros na administração dos medicamentos pelos tutores, pela resposta imunológica dos cães (PROVERBIO et al., 2014a) ou pela resistência do parasito aos fármacos empregados (MANNA et al. 2015; WOERLY et al., 2009).

6 Conclusão

A terapia com miltefosina e alopurinol promoveu a redução dos sinais clínicos sistêmicos e dermatológicos, com redução do escore clínico, da carga parasitária e intensidade da inflamação cutânea dos cães com LVC, apesar de se observar lesões microscópicas mesmo nos cães com a pele de aparência normal.

Referências

- ABBEHUSEN, M. M. C.; ALMEIDA, V. D. A.; SOLCÀ, M. D. S.; PEREIRA, L. D. S.; COSTA, D. J.; GIL-SANTANA, L.; BOZZA, P. T.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T.; DOS-SANTOS, W. L. C.; ANDRADE, B. B.; & BRODSKYN, C. I. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15914, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-15651-8>. Acesso em 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15651-8>.
- AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. **Revista Unimontes Científica**, v. 19, n. 1, p. 192-204, 2017.
- ALMEIDA, A. do B. P. F. de; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1610-1615, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/kSLgrKV66568qcJsWGKGDxw/?lang=pt>. Acesso em: 10 de fev. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000102>.
- ALMEIDA, A. do B. P. F. de; SOUSA, V.R.F.; CRUZ, F.A.C.S. da; DAHROUG, M.A.A.; FIGUEIREDO, F.B.; MADEIRA, M. de F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 359-365, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/q3rFFTVg7nDfMxLt5rSWXhj/?lang=en>. Acesso em: 10 de fev. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012005000005>.
- ANDRADE, T. S. et al. Frequência de sinais observados ao exame físico de cães com leishmaniose visceral. **MEDTROP**, 2018.
- ARTACHO, N. S. A leishmaniose no brasil e o conflito ideológico: eutanásia ou tratamento. **Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas- UniFMU. São Paulo**, 2009. Disponível em: <https://arquivo.fmu.br/prodisc/medvet/nsa.pdf>. Acesso em: 14 de fev. 2024.
- ARUMUGAM, S.; SCORZA, B. M.; PETERSEN, C. Visceral leishmaniasis and the skin: Dermal parasite transmission to sand flies. **Pathogens**, v. 11, n. 6, p. 610, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/6/610>. Acesso em: 10 fev. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11060610>.
- AYRES, E. D. C. B. S.; DIAS, Á. F. L. R.; MONTEIRO, B. R. G.; PAZZINI, S. S.; BARBOSA, M. E. C.; SILVA, E. B. D; MACEDO, L. F. D. C.; SOUSA, V. R. F.; DUTRA, V., NAKAZATO, L.; ALMEIDA, A. D. B. P. F. Clinical and parasitological impact of short-term treatment using miltefosine and allopurinol monotherapy or combination therapy in canine visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/hgfNLPm8XY3BZ7f5S5WXdQF/?lang=en>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022040>.
- BANETH, G.; SEGEV, G.; MAZAKI-TOVI, M.; CHEN, H.; KUZL. Renal dialysis and long-term treatment of a dog with kidney disease associated with canine leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2018. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2719-6>. Acesso em: 14 fev. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2719-6>.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGOS, L. Leishmaniasis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 52, n. 6, p. 1359–1375, nov. 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561622000870?via%3Dihub>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.06.012>.

BASANO, S. de A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328-337, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbepid/a/rX8bfw89BwD8qQZfvs6x3B/>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300010>.

BENCHIMOL, J. L.; GUALANDI, F da C.; BARRETO, D.C.dos s.; PINHEIRO L. de A. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 14, n. 2, p. 611–626, ago. 2019.

BHATTARAI, N. R.; VAN DER AUWERA, G.; KHANAL, B.; DE DONCKER, S., RIJAL, S.; DAS, M. L.; URANW, S.; OSTYN, B.; PRAET, N.; SPEYBROECK, N., PICADO, A.; DAVIES, C., BOELAERT, M.; & DUJARDIN, J. C. PCR AND DIRECT AGGLUTINATION AS LEISHMANIA INFECTION MARKERS AMONG HEALTHY NEPALESE SUBJECTS LIVING IN AREAS ENDEMIC FOR KALA-AZAR. **Tropical Medicine & International Health**, v. 14, n. 4, p. 404-411, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3156.2009.02242.x>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02242.x>

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. **Rev Virtual Quim**, v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v9n3a04.pdf>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI:10.21577/1984-6835.20170055

BOTANA, L.; MATÍA, B.; SAN MARTIN, J. V.; ROMERO-MATÉ, A.; CASTRO, A.; MOLINA, L.; FERNANDEZ, L.; IBARRA-MENESES, A.; AGUADO, M.; SÁNCHEZ, C.; HORRILLO, L.; CHICHARRO, C.; NIETO, J.; ORTEGA, S.; RUIZ-GIARDIN, J. M.; CARRILLO, E.; MORENO, J. Cellular markers of active disease and cure in different forms of Leishmania infantum-induced disease. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 381, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00381/full>. Acesso em: 10 fev. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00381>.

BRASIL. (2016). Nota técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Coordenação de fiscalização de produtos veterinários-DFIP-SDA-CPV.

BRASIL. Leishmaniose Visceral. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 17 nov. 2023.

BRASIL. **Mapa suspende fabricação e venda e determina o recolhimento de lotes de vacina contra Leishmaniose**. Disponível em:

<<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contra-leishmaniose-apos-fiscalizacao>>. Acesso em: 17 nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde (2008). Portaria interministerial Nº 1.426 Disponível em:https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html. Acesso em: 17 nov. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**, 2006. Disponível em:
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerai.pdf. Acesso em: 10 fev. 2024.

BRASILEISH. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina. Diretrizes. Brasileish. 2018. Disponível em:
<https://www.brasileish.com.br/diretrizes.html>. Acesso em: 17 nov, 2023.

BRITO, V. N. D.; DIAS, Á. F. D. L. R.; SOUSA, V. R. F. Epidemiological aspects of Leishmaniasis in the Pantanal region of Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 744–749, dez. 2019. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rbpv/a/qh3ZtyNNwzSSrkqRpGrzwHQ/?lang=en>. Acesso em: 10 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019061>

BRITO, V. N. de.; OLIVEIRA, C.M.; LAZARI, P.; SOUSA, V.R.F. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in Jaciara, Mato Grosso, Brazil, 2003 to 2012. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 63-68, 2014. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rbpv/a/g6P7Yykr3SZbVrDSXTHwVjd/?lang=en>. Acesso em 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014008>.

BRITO, V.N.de.; ALMEIDA, A.do B.P.F.; NAKAZATO, L.; DUARTE, R.; SOUZA, C.deO.; SOUSA, V.R.F. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 899-904, 2014.a Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/mioc/a/8fkJZCRRF93LgXjywjjx9sd/?lang=en>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-0276140112>

CARDOSO, J. M. O.; KER, H. G.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; MOREIRA, N. D. D.; MATHIAS, F. A. S.; REIS, L. E. S.; ROATT, B. M.; VIEIRA, P. M. A.; COURAVITAL, W.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Association between mast cells, tissue remodeling and parasite burden in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 243, p. 260-266, 2017. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401717302418?via%3Dihub>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.028>.

CASTRO, I. P.; SOUSA, M.V.C de; MAGALHÃES, G.M.; MUNDIM, A.V.; NOLETO, P.G.; PAULA, M.B.C. de; PAJUABA NETO, A. de A.; MEDEIROS, A.A. Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral. **Biosci. J.**, v. 28, p. 799-804, 2012. Disponível em:
<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/09/914321/perfil-hepatico-e-proteico-em-caes-com-leishmaniose-visceral.pdf>. Acesso em: 14 fev 2024.

CHAGAS, Ú.M.R.; AVELAR, D.M.; MARCELINO, A.P.; PAZ, G.F.; GONTIJO, C.M.F.; Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 291, p. 109368, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401721000285?via%3Dihub>. Acesso em 10 fev. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109368>.

DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G.; BANETH, G.; BOURDEAU, P.; BREITSCHWERDT, E.; CAPELLI, G.; CARDOSO, L.; DAY, M. J.; DOBLER, G.; FERRER, L.; IRWIN, P.; JONGEJAN, F.; KEMPF, V. A. J.; KOHN, B.; LAPPIN, M.; LITTLE, S.; MADDER, M.; MAGGI, R.; MAIA, C.; MARCONDES, M.; ... OTRANTO, D. Canine leishmaniasis control in the context of one health. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 12, p. 1, 2019b. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/12/19-0164_article. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2512.190164>.

DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G.; BOWMAN.; GRADONI, L.; OTRANO, D. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 97–101, fev. 2019a. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922\(18\)30243-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492218302435%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922(18)30243-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492218302435%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.005>.

DIAS, Á. F. L. R.; AYRES, E. D. C. B. S.; DE OLIVEIRA MARTINS, D. T.; MARUYAMA, F. H.; DE OLIVEIRA, R. G.; DE CARVALHO, M. R.; ALMEIDA, A. D. B. P. F.; TEIXEIRA, A. L. S.; MENDONÇA, A. J.; & SOUSA, V. R. F. Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 217, p. 107947, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001448942030148X?via%3Dihub>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107947>

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v1n2/v1n2a02.pdf>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: 10.5123/S2176-62232010000200002.

FIGUEIREDO, M. M.; MOURA, E. P.; COSTA, M. M.; RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L.; & TAFURI, W. L. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Histology and histopathology**, 2010. Disponível em: https://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_25/25_7/25_7_877.htm. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.14670/HH-25.877>.

FREITAS, E. O.; LEORATTI, F.M. de S.; FREIRE-DE-LIMA, C, G.; MORROT, A.; FEIJÓ, D.F.; The contribution of immune evasive mechanisms to parasite persistence in visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 153, 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2016.00>

153/full. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00153>.

GASPARETTO, N. D.; BEZERRA, K.S.; SOARES, L. C. M; MAKINO, H.; OLIVEIRA, A. C.S.; COLODEL, E. M.; ALMEIDA, A. B.P.F.; SOUSA, V. R. F. Aspectos clínicos e histológicos da demodicose canina localizada e generalizada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 496-501, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/yqhKkg8skgRh7k5XSZQB7j/?lang=pt>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4911>.

GONÇALVES, A. A. M.; LEITE, J. C.; RESENDE, L. A.; MARIANO, R. M. D. S.; SILVEIRA, P.; MELO-JÚNIOR, O. A. O.; RIBEIRO, H. S.; DE OLIVEIRA, D. S.; SOARES, D. F.; SANTOS, T. A. P.; MARQUES, A. F.; GALDINO, A. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; DUTRA, W. O.; DA SILVEIRA-LEMONS, D.; & GIUNCHETTI, R. C. An overview of immunotherapeutic approaches against canine visceral leishmaniasis: what has been tested on dogs and a new perspective on improving treatment efficacy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 427, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00427/full>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00427>.

JACINTHO, A. P. P. Análise da expressão de MMP-2 e MMP-9 na pele de cães com Leishmaniose visceral. 2012. xii, 54 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/15970c57-aebb-453c-91ec-933b4256c783/content>. Acesso em: 14 fev 2024.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. (No Title), 1993.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary pathology**, 51(2), 527–538. 2014. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985814521248>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985814521248>

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 251, 2012. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2012.00251/full>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00251>.

LANGHORN, R. et al. Cardiac troponin I and T as prognostic markers in cats with hypertrophic cardiomyopathy. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 28, n. 5, p. 1485-1491, 2014. Disponível em: Acesso em: 14 fev 2024. DOI:

LEITE, B. M. M.; SOLCÀ, M. D. S.; SANTOS, L. C. S.; COELHO, L. B.; AMORIM, L. D. A. F.; DONATO, L. E.; PASSOS, S. M. S.; ALMEIDA, A. O.; VERAS, P. S. T.; & FRAGA, D. B. M. The mass use of deltamethrin collars to control and prevent canine visceral leishmaniasis: A field effectiveness study in a highly endemic area. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. e0006496, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29758031/> Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006496>.

MANNA, L.; CORSO, R.; GALIERO, G.; CERRONE, A.; MUZZI, P.; & GRAVINO, A. E. Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 289, dez. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26017164/>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0896-0>.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PICILLO, E.; PAVONE, L. M.; & GRAVINO, A. E. Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 2, p. 279-282, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17553711/> Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.04.013>.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 261–272, abr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30708238/>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>.

MARTÍNEZ, V.; QUÍLEZ, J.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. FRANCINO, O.; ALTET, L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2011. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-4-57#citeas>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-57>

MARTÍNEZ-FLÓREZ, I.; GUERRERO, M. J.; DALMAU, A.; CABRÉ, M.; ALCOVER, M. M.; BERENGUER, D.; GOOD, L.; FISA, R.; RIERA, C.; ORDEIX, L.; & SOLANO-GALLEGÓ, L. Effect of Local Administration of Meglumine Antimoniate and Polyhexamethylene Biguanide Alone or in Combination with a Toll-like Receptor 4 Agonist for the Treatment of Papular Dermatitis due to Leishmania infantum in Dogs. **Pathogens** (Basel, Switzerland), 12(6), 821. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/12/6/821>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens12060821>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**. 2014.

MORALES-YUSTE, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; CORPAS-LOPEZ, V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 387, 27 jul. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36006301/>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci9080387>.

NABITY, M. B.; LEES, G. E.; BOGGESS, M. M.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; RAKITIN, A.; AGUIAR, J.; & RELFORD, R.. Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 4, p. 1036-1044, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4895368/>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/jvim.12835>.

NOGUEIRA, F. S.; F., AVINO; V. C.; GALVIS-OVALLOS, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; MOREIRA; M. A. B.; ROMARIZ, A. P. P. L.; MENZ, I. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2019. Disponível em:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3323-0>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3323-0>.

OLIVA, G.; ROURA, X.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; CASTAGNARO, M.; GRADONI, L.; LUBAS, G.; PALTRINIERI, S.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1192-1198, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20513197/>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.236.11.1192>.

OLIVEIRA, K. W. de. Utilização da PCR diagnóstica, imunohistoquímica e perfil epidemiológico de *Leishmania* em cães no município de Porto Nacional-TO. 2017. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. Disponível em: Utilização da PCR diagnóstica, imunohistoquímica e perfil epidemiológico de *Leishmania*... (usp.br). Acesso em: 02 março 2024. DOI: <https://doi.org/10.11606/T.85.2019.tde-05122018-100006>.

OPAS Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. Núm. 12 (Dezembro de 2023) - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde (paho.org)

ORDEIX, L.; DALMAU, A.; OSSO, M.; LLULL, J.; MONTSERRAT-SANGRÀ, S.; SOLANO-GALLEGO, L. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 10, p. 1-8, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28288670/>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2051-6>.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; VLEMMAS, J.; LEKKAS, S.; KARAMERIS, A.; FYTIANOU, A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 104, n. 3-4, p. 227-237, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15734543/>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.12.001>.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, n. 3-4, p. 94-102, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25555497/> Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.011>.

PFARR, K. M.; KROME, A. K.; AL-OBAIDI, I.; BATCHELOR, H.; VAILLANT, M.; HOERAUF, A.; OPOKU, N. O.; KUESEL, A. C. The pipeline for drugs for control and elimination of neglected tropical diseases: 2. Oral anti-infective drugs and drug combinations for off-label use. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 394, 31 out. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37907954/> Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05909-8>

PROPHET, E. B. (Ed.). **Laboratory methods in histotechnology**. American Registry of Pathology, 1992.

PROVERBIO, D.; SPADA, E.; DE GIORGI, G. B.; PEREGO, R. Failure of Miltefosine Treatment in Two Dogs with Natural *Leishmania infantum* Infection. **Case Reports in Veterinary Medicine**, v. 2014, p. 1–6, 2014a. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/crivem/2014/640151/> Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/640151>

PROVERBIO, D.; SPADA, E.; BAGNAGATTI DE GIORGI, G.; PEREGO, R., VALENA, E. Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014b. Disponível em: Acesso em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24995294/>. 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/412808>

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M.; FERREIRA, E.DEC.; DA ROCHA-LIMA, A. C.; XAVIER, A. A.; GONTIJO, C. M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 289-294, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19467216/> Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.05.008>

RIBEIRO, V. M.; MIRANDA, J. B.; MARCELINO, A. P.; DE ANDRADE, H. M., REIS, I. A.; CARDOSO, M. S.; GONTIJO, C. M. F.; PAZ, G. F. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 274, p. 108920, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31493694/> Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.014>

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells using proteinase K and phenol. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 1, p. pdb. prot4036, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28974655/>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093492>

SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; UTZET-SADURNI, M.; GIGER, U.; SANCHEZ, A.; FRANCINO, O. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 39, n. 3, p. 36, 2008. Disponível em: Acesso em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18307968/>. 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres:2008013>

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) (sin. veterinary dermatology, 25(2), 61–e22. 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vde.12105>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/vde.12105>

SCHÄFERI.; MÜLLER, E.; NAUCKE, T. J. Canine leishmaniosis: an update regarding diagnostics, therapeutic approaches, and monitoring. **Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/heimtiere**, v. 50, n. 6, p. 431-445, 2022. Não achei no texto

SCORZA, B. M., MAHACHI, K. G., COX, A. C., TOEPP, A. J., LEAL-LIMA, A., KUMAR KUSHWAHA, A., KELLY, P., MENESES, C., WILSON, G., GIBSON-CORLEY, K. N., BARTHOLOMAY, L., KAMHAWI, S., PETERSEN, C. A. *Leishmania infantum* xenodiagnosis from vertically infected dogs reveals significant skin tropism. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 10, p.

e0009366, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34613967/>
Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009366>.

SILVA, M. A. L.; MEDEIROS, R.A.; BRANDÃO-FILHO, S.; LOPES, MELO, F.L. de.; MEDEIROS, Z. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 3, p. 15-15, 2010.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19559536/>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G.; THE LEISHVET GROUP. Diretrizes LeishVet para o manejo prático da leishmaniose canina. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 1-16, 2011. Disponível em: Acesso em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21599936/> 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>

STEVEDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 15 fev. 2017. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2028-5#citeas> Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

VERÇOSA, B. L.; LEMOS, C. M.; MENDONÇA, I. L.; SILVA, S. M.; DE CARVALHO, S. M.; GOTO, H.; COSTA, F. A. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 1-7, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18990238/> Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-45>

VIDES, J. P.; MORAES, L. R. S. Tratamento da Leishmaniose visceral canina com miltefosina—relatos de casos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 16, n. 3, p. 80-80, 2018. Disponível em: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/37830>. Acesso em: 14 fev 2024.

WHO. Leishmaniose. Disponível em: < Leishmaniasis (who.int) > em: 17 nov 2023.

WOERLY, V.; MAYNARD, L.; SANQUER, A.; EUN, H. M. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitology Research**, 105(2), 463–469. 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-009-1404-2>. Acesso em: 14 fev 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1404-2>

DIAS, A. F. L. R.; ALMEIDA, A. B. P. F.; CRUZ, F. A. C. S.; SILVA, R. R., RODRIGUES, J. Y.; OTSUBO, A. A. F.; SOUSA, V. R. F. Seroprevalence and spatial analysis of canine visceral leishmaniasis in the Pantanal region, Mato Grosso State, Brazil. **Journal Zoonotic Dis Public Health**, v. 1, n. 1, p. 1-7,

2017. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/336103603_Seroprevalence_and_Spatial_Analysis_of_Canine_Visceral_Leishmaniasis_in_the_Pantanal_Region_Mato_Grosso_State_Brazil. Acesso em: 14 fev 2024.

APÊNDICE A

Tabela 1 – Sinais clínicos dermatológicos (SCC), alterações no exame histopatológico de pele, amastigota *L. infantum* no corte histológico corados por hematoxilina-eosina (HE) e imuno-histoquímica (IHQ) e carga parasitária em cães com leishmaniose visceral antes (D0) e após (D150) o tratamento com miltefosina e alopurinol

N	D0							D150						
	SCC	Histopatológico					qPCR*	SCC	Histopatológico					qPCR*
		Pele							Pele					
		Epiderme	Derme	Paniculo	HE	IHQ			Epiderme	Derme	Paniculo	HE	IHQ	
1	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	1.322×10 ⁵	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	4.602×10 ⁴
2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	1.218×10 ⁴	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	5.277×10 ³
3	Não	Não	Não	Não	Não	Não	8.83×10 ⁴	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	4.129×10 ⁴
4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	1.63×10 ⁶	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	1.913×10 ⁶
5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	7.734×10 ⁵	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	4.078×10 ⁴
6	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	4.958×10 ⁷	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	3.291×10 ⁴
7	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	2.539×10 ⁶	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	5.742×10 ⁵
8	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	1.327×10 ⁶	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	1.906×10 ⁵
9	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	2.501×10 ⁶	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	9.363×10 ⁴
10	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	9.667×10 ⁶	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	1.454×10 ⁵
11	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	4.035×10 ⁵	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	2.28×10 ⁶
12	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	4.372×10 ³	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	4.626×10 ³
13	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	4.197×10 ⁵	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	2.134×10 ⁴
14	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	1.202×10 ⁶	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	4.46×10 ³
15	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	2.939×10 ⁵	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	8.757×10 ³
16	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	1.34×10 ⁶	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	4.751×10 ³

17	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	8.431×10^3	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	ND
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----

ND: não detectado

*número de cópias (10^{10})/ μ l

SCC: Sinal Clínico Cutâneo

Sim: Presença de sinais clínicos dermatológicos e alteração no exame histopatológico de pele

Não: Ausência de sinais clínicos dermatológicos e alteração no exame histopatológico de pele

APÊNDICE B – Ficha exame histopatológico pele

Projeto tratamento LVC – Ficha exame histopatológico de pele

PACIENTE: _____ NPP: _____

TEMPO TRATAMENTO: D0 () D150 ()

IDENTIFICAÇÃO DA LÂMINA: _____

Alterações da epiderme

Ausente ()

Acantose: (N) (L) (M) (A)

Hiperqueratose: (N) (L) (M) (A) - tipo: () Paraqueratótica () Ortoqueratótica

Úlcera: () sim () não - se sim: () Focal () Focalmente extensa () Difusa

Crostras: () Focal () Focalmente extensa () Difusa

*N: não

*L: leve

*M: Moderada

*A: Acentuada

Comentário: _____

Alterações da derme

- Quanto à inflamação:

() Ausente () Discreto () Leve () Moderada () Acentuada

Localização: _____

- Quanto ao exsudato:

() Macrófago () Macrófagos espumosos () Plasmócitos

() Linfócitos () Neutrófilos

Outro? Qual _____

- Granulomas:

() Sim () Não

Alterações de glândulas sebáceas

- Quanto à inflamação:

() Ausente () Discreto () Leve () Moderada () Acentuada

- Se houver inflamação, classifique o exsudato:

() Mononuclear () Polimorfonuclear () Misto

Outro? Qual _____

() Ausência de glândula sebácea

Outras observações:

Panículo

Presença de amastigotas

() Sim () Não

APÊNDICE C - Artigo

Clinicopathologic findings and parasite load on the skin of dogs with visceral leishmaniasis treated with miltefosine and allopurinol

Maria S. Freitas¹ (0000-0001-8776-4959), **Maria N. Freitas**¹ (0000-0002-7890-3010), **Arlyson S. Ferreira**¹ (0000-0003-4385-5650), **Luciano Nakazato**¹ (0000-0002-1244-0690), **Arleana B. P. F. Almeida**¹ (0000-0002-6694-1407), **Naiani D. G. Veggi**¹ (0000-0001-7399-7540), **Edson M. Colodel**¹ (0000-0002-0048-9702), **Juliano Bortolini**¹ (0000-0003-0126-3040), **Adriane J. Mendonça**¹ ([0000-0002-9367-5028](https://orcid.org/0000-0002-9367-5028)), **Valéria R. F. Sousa**¹ (0000-0001-6209-4514)

¹ Federal University of Mato Grosso – Campus Cuiabá/MT - Av. Fernando Correa da Costa, nº2367, Boa Esperança, Cuiabá-MT, CEP 78060-900

Correspondence author: Telephone +55 65 3615-8662; valeriaregia27@gmail.com; ¹ Federal University of Mato Grosso – Campus Cuiabá/MT - Av. Fernando Correa da Costa, nº2367, Boa Esperança, Cuiabá-MT, CEP 78060-900

Abstract:

Visceral leishmaniasis is a zoonosis with thousands of new cases annually around the world. In Brazil, it represents a serious public health problem. In dogs, the skin plays an important role in the immunopathogenesis of the disease, as it is the first organ infected by the parasite. Furthermore, due to the dermatropic appearance of *L. infantum*, there is a high parasite load, which facilitates infectivity to the vector. Therefore, this study aimed to evaluate the clinical and histopathological findings and the parasitic load on the skin of dogs with visceral leishmaniasis treated with miltefosine associated with allopurinol. Seventeen dogs were evaluated before and after 150 days of starting treatment, undergoing skin, blood, and urine samples to establish the clinical score and describe the clinical dermatological findings and histopathological aspects, in addition to quantifying the parasitic load of the skin by qPCR. After treatment, there were a reduction in the clinical score and laboratory abnormalities, with remission of some clinical signs. The main skin changes initially observed were alopecia/hypotrichosis, ulcerative dermatitis, exfoliative dermatitis and nasodigital hyperkeratosis. After treatment, there was a reduction in macroscopic lesions and a decrease in inflammation, with a predominance of macrophages in the inflammatory infiltrate, in addition, there was a significant reduction in the parasitic load in all dogs. Miltefosine in association with allopurinol promoted a decrease in the clinical score, a reduction in the parasite load, as well as a decrease in the intensity of cutaneous inflammation in dogs within 150 days of treatment.

Keywords: *Leishmania infantum*; skin diseases; clinical score; histopathological examination; macrophage; qPCR

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a complex disease and is as one of the main neglected parasitic diseases in the world (Pfarr et al. 2023). Brazil is among the countries with the highest number of VL cases and in Latin America it accounts for 95.1% of notifications (Marcondes and Day 2019). It is a chronic and fatal disease if untreated (Chagas et al. 2021; WHO, 2022). VL is caused by the protozoan *Leishmania infantum* (syn.: *L. chagasi*). Infected female sand flies (*Lutzomyia longipalpis* and *L. cruzi*) inoculate promastigote forms into the dermis of humans or reservoirs (Brito et al. 2019). In the urban environment, the dog is considered the main reservoir and acts in the epidemiological chain of the disease, both by sharing the same ecotope and by presenting a high skin parasitic load, providing infectivity to the vector (Arumugam et al. 2022), thus maintaining the VL endemicity (Solano-Gallego et al. 2009; Chagas et al. 2021).

Once infected, the dog may remain asymptomatic or develop varying clinical signs (Rosário et al. 2019) according to the intensity of the anti-inflammatory or pro-inflammatory response (Freitas et al. 2016). General clinical signs include hepatomegaly, splenomegaly, lymphadenopathy, hyperthermia, apathy, cachexia, ophthalmopathy, epistaxis and diarrhea. However, around 80 to 90% of dogs with canine leishmaniasis (CanL) show dermatological signs characterized by different patterns of lesions (Almeida et al. 2010; Solano-Gallego et al. 2011): dry seborrhea, exfoliative dermatitis, ulcers, nodules and/or papules (Papadogiannakis and Koutinas 2015). In histopathology, there are an infiltrate of macrophages with or without amastigotes, plasma cells, lymphocytes, and neutrophils in the dermis, but the predominance of cells in the inflammatory infiltrate may vary according to the parasite load. (Verçosa et al. 2008).

In Brazil, despite euthanasia still being a measure used, the treatment of dogs with CanL advanced in 2016, with the approval of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) for the commercialization of miltefosine. This is a drug with leishmanicidal activity, registered in India for the treatment of VL in 2005 (Manna et al. 2015). While allopurinol has leishmaniostatic activity, it is an analogue of hypoxanthine that acts by interfering with the parasite's normal protein synthesis, as it is grouped in place of ATP during RNA synthesis (Gonçalves et al. 2019). Studies have demonstrated an improvement in the clinicopathological score and a reduction in infectivity in dogs with CVL treated with miltefosine alone or in combination with allopurinol, but they do not induce a parasitological cure (Nogueira et al. 2019; Dias et al. 2020). Although there is a study that demonstrates a reduction in parasite load on the skin in the short term with this protocol (Ayres et al. 2022), there is still a gap regarding the macro and microscopic changes in the skin of dogs undergoing treatment for a longer period.

In this context, the objective of this study was to evaluate the clinical and skin histopathological findings and the parasite load in the skin of dogs with visceral leishmaniasis treated with miltefosine in association with allopurinol followed for 150 days.

Materials and methods

Study design

From August 2022 to October 2023, dogs naturally infected with *L. infantum* were prospectively enrolled, previously diagnosed at the Veterinary Hospital of the Federal University of Mato Grosso (HOVET – UFMT) Cuiabá campus or by the Cuiabá Zoonoses Surveillance Unit (UVZ). The inclusion criteria were dogs of any breed and sex, over six months of age, with clinical signs and/or laboratory

changes suggestive of CanL, with amastigote forms in the parasitological examination of the bone marrow or lymph node or reagent in the serology (immunochromatographic rapid strip, IFAT, or ELISA). Exclusion criteria were pregnancy or lactation, or dogs with a history of previous treatment for CanL.

Treatment and clinical examination

With the consent of the owners, a therapeutic protocol was instituted with miltefosine 2 mg/kg (Milteforan®, Virbac), per os, once a day, for 28 consecutive days in association with allopurinol 10 mg/kg, per os, twice a day, for five consecutive months (150 days) (Solano-Gallego et al. 2009). Additionally, collars impregnated with deltamethrin were used in all dogs.

The dogs were examined on days D0 (one day before treatment) and D150 (after 150 days of treatment) and clinical signs, laboratory findings and clinical score were recorded. The clinical score was evaluated and the severity of clinical signs, attributed to the infection, was scored on a scale of 0 to 3, where 0 indicates no clinical sign; 2 moderate clinical signs and 3 severe clinical signs, which can then total up to 86 points (Proverbio et al. 2014). Photographic records were taken during the visits and attached to the medical records for follow-up.

Hematological, biochemical, and urinary analysis

Blood samples were collected by puncture of the external jugular vein or cephalic vein, on the same days that the clinical score was monitored. The complete blood count was performed using the automated Poche 100 Hematological Analyzer (Roche®), with subsequent checking of the blood smear under light microscopy (Jain 1993). And serum biochemistry (alanine aminotransferase (ALT); alkaline phosphatase (ALP), urea, creatinine, protein total serum, albumin) was performed with commercial kits on the Wiener® Automated Biochemical Analyzer (Kaneko 2008). The albumin/globulin ratio was determined from the concentration of albumin and serum globulin.

The urine sample was processed within one hour of collection by natural voiding, urethral catheterization, or cystocentesis. Subjected to physical-chemical analysis (Combur test® kit) and sedimentoscopy. Urinary density was determined by refractometry. Urinary protein and creatinine were assessed to estimate proteinuria (UP/C).

Biopsy, histopathological examination, and immunohistochemistry

The skin biopsy was performed after local subcutaneous anesthesia with 2% lidocaine without vasoconstrictor, with a 5 mm punch. Four skin fragments were collected from the prescapular region, two for molecular test and two for histopathological examination. Then, the samples were fixed in 10% buffered formalin solution, embedded in paraffin, cut at 5µm, and stained with hematoxylin-eosin (HE) (Prophet et al. 1992). The histopathological analysis was conducted by an evaluator and the changes relating to the epidermis, dermis, hair follicles, sebaceous glands, and inflammatory infiltrate were noted and grouped (discreet, mild, moderate, severe) in a standardized and individualized histological form.

Immunohistochemistry was performed as described by Oliveira (2017) with modifications. Briefly, the MACH 4 Universal HRP-Polymer KIT from BIOCARE MEDICAL (Pacheco, CA, USA) was used as an immunohistochemical detection system. The samples were incubated overnight with an anti-*Leishmania amazonensis* polyclonal primary antibody produced by the University of São Paulo School of Medicine (São Paulo, SP, Brazil).

DNA extraction and qPCR

DNA extraction from skin samples (25 grams) was processed by the phenol chloroform method (Sambrook and Russell 2001) and subsequently quantified on a NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific). To verify the integrity of the DNA and the absence of inhibitors, the samples were treated with RNase and tested for the endogenous canine β -globin gene (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3' and 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC -3'), which amplifies a 119bp fragment (Quaresma et al. 2009). q-PCR was performed in triplicate using the primers RV1- 5'-CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G-3' and RV2 - 5'- CCA CCT GGC TAT TTT ACA CCA-3' which amplify a 145bp sequence, specific to *L. infantum* (kDNA) (Lachaud et al. 2002). The program consisted of 10 min at 94°C; 40 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, 30 seconds at 72°C and a final extension of 10 minutes at 72°C (Fornelio et al. 2003). A standard curve was established for each assay using known amounts of plasmid (TOPO PCR 2.1 (Invitrogen Corp) containing the *L. infantum* kDNA gene. A series of dilutions containing 2×10^4 to 2×10^8 copies of the recombinant plasmid were performed to establish the standard curve. A negative control containing water without DNA was used in all reactions (Ayres et al. 2022).

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the SPSS 22.0 for Windows software (SPSS Inc., USA). The data were tabulated in Microsoft® Excel® spreadsheets. Quantitative variables were tested with paired t-test with Cohen's d effect size and CBa bootstrap confidence interval. All bootstrap procedures were performed with 1000 resamples. In qualitative variables, the Stuart-Maxwell test was performed to compare proportions of categories in paired data with more than two answers, testing the hypothesis of equality of proportions over time. Differences were considered significant with a 5% significance level ($P < 0.05$).

Results

All dogs were considered symptomatic before treatment. After 150 days, 70.5% (12/17) persisted with clinical signs, even if milder. The average clinical score of the dogs before treatment was 12.47, there was a significant reduction ($p < 0.001$) to 3.58 (scale from 0 to 86) on D150. This reduction in the score converges with weight gain ($p = 0.004$), a reduction in parasitic load and a decrease in the severity of skin lesions.

Of the seventeen dogs, nine females (52.9%) and eight males (47%), with an average age of 58.18 months and a median of 48 months, with a minimum age of 6 months and a maximum of 12 years. Regarding breed, 41.17% (7/17) of the dogs did not have a defined breed (SRD) while 58.82% (10/17) had a defined breed, being: two Dachshunds, one American Bully, one Akita, one Pinscher, two American Pitbulls, one Poodle, one Australian Cattle Dog, and one Labrador Retriever.

Initially, 76.4% (13/17) dogs had anemia, reducing to 29.4% (5/17) dogs with treatment, reflecting the significant increase in erythrogram values (Table 1) after 150 days. The mean values of total proteins and globulins decreased, while albumin (Figure 1) increased with a statistically significant difference before and after D150. The same occurred in the mean values of creatinine, and alanine aminotransferase, however, both remained within the reference values (Table 1).

On D0, 88.2% (15/17) of the dogs had dermatopathies (Figure 2). Ulcerative dermatitis was one of the most observed changes, seen in 88.2% (15/17) dogs, of these, only one dog (6.6%) had a diffuse distribution and in the other dogs, the lesions were located on the limbs, tip of ears, lip, sacroiliac region and/or breast. Followed by alopecia/hypotrichosis in 93.3% (14/15) dogs, exfoliative dermatitis 73.3% (11/15), onychogryphosis 46.6% (7/15), nodular dermatitis 26.6% (4/15), nasodigital hyperkeratosis 26.6% (4/15) and generalized hyperkeratosis 13.3% (2/15) dogs. One dog did not present dermatopathy at the beginning of treatment and remained without these signs until D150. After treatment (D150), no dermatological lesions were observed in thirteen dogs (76.4%) in the dermatological examination. Of the four dogs with dermatopathies, 50% (2/4) dogs exhibited ulcerative dermatitis: in one dog it was located in the mammary region and in the other in the cervical region. Furthermore, there were other lesions in these same animals, including: periocular alopecia (1/25%), exfoliative dermatitis (4/100%), onychogryphosis (3/75%) and nasodigital or elbow hyperkeratosis (3/75%).

Microscopic changes stained with HE were visualized in 17 (100%) dogs at some point during treatment (D0 or D150). On D0, 14 dogs had microscopic lesions and on D150, 16 dogs (Table 6). In the two dogs that did not have cutaneous clinical signs on D0, microscopic lesions were observed on D0 and D150. On D0, one patient had mild orthokeratotic hyperkeratosis. On D150, the same dog continued to have mild orthokeratotic hyperkeratosis, and both had mild inflammation in the dermis composed of macrophages. Regarding the location of the inflammation, in one of the dogs it was multifocal and in the other perivascular. Panniculitis with lobular inflammatory infiltrate with macrophages and plasma cells was also observed in one of them.

On D0, 14 (82.4%) had mild (12/70.6%) to moderate (2/11.8%) orthokeratotic hyperkeratosis in the epidermis. In one (5.9%) dog, a focal crust was observed. In the dermis, inflammatory infiltrate was observed in 13 (76.5%) of the dogs, predominantly mononuclear (11/64.7%), followed by mixed (2/11.8%) with moderate/severe intensity in 7 (41.2%) dogs and mild/mild in 6 (35.3%) dogs. The macrophage, the predominant cell observed in 100% of dogs with inflammation, followed by plasma cells, neutrophils and lymphocytes. The inflammatory pattern observed ranged from perivascular, periannexal and interstitial, mainly in the superficial dermis, and only one dog had a diffuse distribution (Figure 15). Panniculitis was observed in 7 (41.2%) dogs.

On D150, 16 (94.1%) dogs still had orthokeratotic hyperkeratosis classified as mild (Table 6). One dog had acanthosis at D150, classified as moderate, not observed before treatment. Inflammation in the dermis persisted at D150, seen in 14 (82.4%) of the dogs, but with a reduction in the intensity of inflammation, as in 13 (76.5%) dogs in the mild/moderate and in 1 (5.9%) dog, moderate. Of these, the mononuclear inflammatory infiltrate in 14 (82.4%) of the dogs. The inflammatory pattern observed varied from perivascular, periadnexal and interstitial, mainly in the superficial dermis. There was also improvement in panniculitis observed in only 3 (17.3%) of the dogs after treatment.

Amastigotes were observed in six (35.3%) dogs in skin samples stained with HE on D0, and on D150, only 1 (5.9%) dog had an amastigote, significantly reducing the number of dogs with amastigotes. ($p=0.025$). While, in immunohistochemistry at D0, amastigotes were observed in 9/17 (52.9%) dogs, while at D150 positive staining was observed in 5/17 (29.9%) of dogs (Figure 3).

By skin qPCR, *L. infantum* DNA was detected in all dogs before treatment and after treatment in 16 dogs (D150). During this period there was a significant reduction ($p = 0.008$) in the average values of the cutaneous parasite load, however, in three dogs an increase in the parasite load was observed even with treatment.

Discussion

In this study, treatment of dogs with miltefosine associated with allopurinol provided remission or reduction of clinical pathological signs, including dermatological lesions. Among the dogs treated there were no dogs of the breeds cited as predisposed to developing the disease, German Shepherd, Boxer, Cocker Spaniel, Doberman Pinscher and Rottweiler (Koutinas and Koutinas 2014; Baneth and Solano-Gallego 2022). Regarding age range, the dogs in this study were not within the most predisposed age ranges, that is, under 3 years old or over 8 years old (Solano-Gallego et al. 2011). However, as the incubation period of *L. infantum* infection is quite variable, three to seven months (Brazil, 2014), and the clinical evolution is chronic, this would justify this temporal variation in diagnosis and initiation of treatment.

The reduction in the clinical score in all dogs followed during the 150 days of treatment was also observed in a study carried out by Dias et al. (2020) of short duration (28 days) with a similar therapeutic protocol, differing only in the dose of allopurinol. Proverbio et al. (2014) also noticed a reduction in the clinical score with the same therapeutic protocol. The improvement in clinicopathological abnormalities showed that the association of miltefosine with allopurinol had good clinical efficacy, as seen by Ayres et al. (2022).

Initially, the dogs presented anemia and hyperproteinemia due to hyperglobulinemia and hypoalbuminemia. These findings are frequent and important for clinical monitoring in CanL (Baneth and Solano-Gallego 2020; Dias et al. 2020; Solano-Gallego et al. 2022). Anemia regressed after treatment and is related to changes in erythropoiesis causing non-regenerative anemia (Morales-Yuste et al. 2022) or to increased hemolysis, due to the entrapment of erythrocytes in the spleen and liver due to the inflammatory response to *L. infantum* (Abbehusen et al. 2017). Albumin and the albumin/globulin ratio increased, and hyperproteinemia and hyperglobulinemia persisted, although it reduced significantly. The elevation of globulins depends on the immunological response and, in association with a high parasite load, induces the formation of immune complexes (Baneth and Solano-Gallego 2022) that can be deposited in target organs such as kidneys, eyes and joints (Koutinas and Koutinas 2014), inducing disease progression. The decrease in albumin, which is considered a negative acute phase protein, occurs because of glomerular injury and due to the inflammatory response, which decreases its production in the liver (Baneth and Solano-Gallego 2022).

Although an increase in the mean ALT values was observed on D150, they remained within the reference values. The same occurred with creatinine, which can be justified by the fact that creatinine is a biomarker of late kidney injury (Nabity et al. 2015). Urinary density and proteinuria did not differ significantly, but there was an increase in proteinuria after treatment, an important biomarker in CanL progression (Baneth et al., 2018).

The cutaneous clinical signs observed in dogs were alopecia/hypotrichosis, ulcerative dermatitis, exfoliative dermatitis and nasodigital hyperkeratosis and are among the dermatological changes most observed in CanL (Almeida et al. 2010; Solano-Gallego et al. 2011) and may be associated to other clinical-

pathological signs or abnormalities. In this study, two dogs of the 17 dogs, did not show dermatological signs, corroborating the description by Koutinas and Koutinas (2014), who reported that skin changes affect up to 90% of sick dogs and along with kidney and/or kidney changes, or eyes are among the main complaints of owners of dogs with CanL. Exfoliative dermatitis, ulcers, nodules, papules that can present alone or in various combinations (Solano-Gallego et al. 2011; Papadogiannakis and Koutinas 2015). Almeida et al. (2010), in a study carried out in Cuiabá, observed furfuraceous dermatitis and skin ulcers as the most frequent clinical dermatological changes, as did Ayres et al. (2022), who noted skin ulcers, onychogryphosis and alopecia as the most frequently observed. Skin ulcers, the clinical sign observed in most dogs in this study, occurs due local vasculitis or trauma and are mainly located on the tip of the ear, limbs and mucocutaneous junctions (Koutinas and Koutinas 2014).

In histopathology, in the two dogs that did not present dermatological signs, microscopically a mild orthokeratotic hyperkeratosis was observed in one of them on D0 and a mild inflammatory infiltrate composed of macrophages in both on D150. In the same way, the dogs still showed microscopic changes after the treatment even without a cutaneous clinical sign. Koutinas and Koutinas (2014) and Verçosa et al. (2008) observed microscopic lesions, such as inflammatory infiltrate in the skin, even in dogs with clinically normal skin (without clinical skin signs), however, they reported greater intensity in the skin of clinically affected dogs. In this study, at D0, 83.33% of dogs presented changes in the epidermis described as orthokeratotic hyperkeratosis. Changes in the epidermis such as orthokeratotic or parakeratotic hyperkeratosis, acanthosis, crusts, and ulcerations are commonly described in skin biopsies from infected dogs (Koutinas and Koutinas, 2014). The observation only of orthokeratotic hyperkeratosis can be justified by the study methodology that standardized the collection of the prescapular region instead of collecting directly from the lesion.

Inflammation of the dermis was described in 76.5% of dogs with a predominance of macrophages. Macrophages are described as the most important cells of this inflammatory infiltrate, constituting the main cellular component of the innate response and in them, the amastigote forms of the protozoan are observed (Papadogiannakis and Koutinas 2015). Papadogiannakis et al. (2005), Verçosa et al. (2008) and Ordeix et al. (2017) described inflammation in the dermis resulting from *L. infantum* infection that can be granulomatous or pyogranulomatous, with a predominance of macrophages and lymphocytes. Skin lesions are attributed to pyogranulomatous inflammation that can affect different skin structures and, less frequently, skin deposition of immune complexes (Koutinas and Koutinas, 2015). After treatment, a decrease in the intensity of inflammation was observed in the histopathological examination, although it persisted in 14 dogs. Cardoso et al. (2017) observed a similar result when evaluating the ear skin of dogs infected by *L. infantum*, concluding that the intensity of the inflammatory reaction of the dermis varies according to the clinical condition, which can be justified by the fact that all dogs achieved an improvement in the score clinical and laboratory with longer treatment time.

The decrease in dogs with amastigotes observed in skin histopathology and immunohistochemistry reinforces the lower mean values of skin parasite load in qPCR in dogs treated with miltefosine and allopurinol. This response to therapy is reflected in clinical signs but can reduce infectivity for the vector (Santos et al. 2019; Morales-Yuste et al. 2022). Ayres et al. (2022) obtained similar results in dogs with CanL after 28 days of treatment with miltefosine in combination with allopurinol. After treatment, three

dogs showed an increase in parasite load, despite the reduction in clinicopathological signs, a fact that may be related to the qPCR technique itself, despite being the gold standard test for quantifying parasite load in tissues of infected dogs (Manna et al. 2008) and can be used for diagnosis, but also for monitoring (Martínez et al. 2011; Chagas et al. 2021). However, this finding warns of failures in the response to therapy: whether due to errors in the administration of medications by owners, the immunological response of the dogs (Proverbio et al. 2014) or the resistance of the parasite to the drugs used (Woerly et al. 2009; Manna et al. 2015).

Conclusion

Therapy with miltefosine and allopurinol promoted the reduction of systemic and dermatological clinical signs, with a reduction in the clinical score, parasite load and intensity of skin inflammation in dogs with CanL, despite microscopic lesions being observed even in dogs with normal-appearing skin.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Federal Agency for the Support and Improvement of Higher Education (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the scholarships.

Author contribution

Maria Sabrina de Freitas and Maria Natália de Freitas developed the investigation, wrote the main manuscript draft, and prepared the figures. Maria Sabrina de Freitas, Maria Natália de Freitas, Arlyson Sousa Ferreira, Luciano Nakazato and Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida made the molecular analysis. Maria Sabrina de Freitas, Naiani Domingos Gasparetto Veggi, and Edson Moleta Colodel made the histopathological analysis. Juliano Bortolini made the statistical analysis. Adriane Jorge Mendonça made the hematological e biochemical analysis. Valéria Régia Franco Sousa made the article conceptualization, funding acquisition, supervision, and review and editing of the main manuscript text. All the authors reviewed the manuscript.

Funding

The study received financial support from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – Edital Universal - 421791/2021-7).

Declarations Ethics approval

The methodology of this research has been approved by the local Ethics Committee of Federal University of Mato Grosso (CEUA – Comitê de Ética no Uso Animal), protocol number 23108.062027/2022-15.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

Abbehusen MMC, Almeida VDA, Solcà MDS, Pereira LDS, Costa DJ, Gil-Santana L, Bozza PT, Fraga DBM, Veras PST, Dos-Santos WLC, Andrade BB, Brodskyn C (2017). Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. Sci Rep, 7(1), 15914. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15651-8>

- Almeida ABPF, Mendonça AJ, Sousa VRF (2010) Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural*, v. 40, p. 1610-1615.
- Arumugam S, Scorza BM, Petersen C (2022). Visceral Leishmaniasis and the Skin: Dermal Parasite Transmission to Sand Flies. *Pathogens*, 11(6), 610. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060610>
- Ayres EDCBS, Dias ÁFLR, Monteiro BRG, Pazzini SS, Barbosa MEC, Silva EBD, Macedo LFDC, Sousa VRF, Dutra V, Nakazato L, Almeida ADBPF (2022) Clinical and parasitological impact of short-term treatment using miltefosine and allopurinol monotherapy or combination therapy in canine visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet*. 1(3), e007222. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022040>
- Baneth G, Solano-Gallego L (2022) Leishmaniasis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. Nov;52(6):1359-1375. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.06.012>
- BRASIL. (2014). Manual de Leishmaniose Visceral. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 17 nov. 2023.
- Brito VN, Dias ÁFLR, Sousa VRF (2019) Epidemiological aspects of Leishmaniasis in the Pantanal region of Mato Grosso. *Rev Bras Parasitol Vet* Oct-Dec;28(4):744-749. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019061>
- Cardoso JMO, Ker HG, Aguiar-Soares RDO, Moreira NDD, Mathias FAS, Reis LES, Roatt BM, Vieira PMA, Coura-Vital W, Carneiro CM, Reis AB (2017) Association between mast cells, tissue remodeling and parasite burden in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* Aug 30;243:260-266. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.028>
- Chagas ÚMR, Avelar DM, Marcelino AP, Paz GF, Gontijo CMF (2021) Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. Mar;291:109368. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109368>
- Dias ÁFLR, Ayres EDCBS, de Oliveira Martins DT, Maruyama FH, de Oliveira RG, de Carvalho MR, Almeida ADBPF, Teixeira ALS, Mendonça AJ, Sousa VRF (2020) Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2020 Oct;217:107947. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107947>
- Fornelio AC, Martinez AM, Buling AS, Barba JCC (2003) Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Vet Parasitol*. May 1;113(3-4):189-201. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(03\)00078-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(03)00078-5)
- Freitas EO, Leoratti FM, Freire-de-Lima CG, Morrot A, Feijó DF (2016) The Contribution of Immune Evasive Mechanisms to Parasite Persistence in Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol*. Apr 22;7:153. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00153>
- Gonçalves AAM, Leite JC, Resende LA, Mariano RMDS, Silveira P, Melo-Júnior OAO, Ribeiro HS, de Oliveira DS, Soares DF, Santos TAP, Marques AF, Galdino AS, Martins-Filho OA, Dutra WO, da Silveira-Lemos D, Giunchetti RC (2019) An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. *Front Cell Infect Microbiol*. Dec 18;9:427. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00427>

- Ikeda, FA, Laurenti MD, Corbett CE, Feitosa MM, Machado GF, Perri SH (2007) Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Braz. j. vet. res. anim. sci, p. 5-11. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26653>
- Jain NC (1993) Essentials of veterinary hematology. Wiley-Blackwell
- Kaneko JJ, Harvey WJ, Bruss LM (2008) Clinical biochemistry of domestic animals. Academic press
- Koutinas AF, Koutinas CK (2014) Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. Vet Pathol. Mar;51(2):527-38. <https://doi.org/10.1177/0300985814521248>
- Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, Bastien P (2002) Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitology. Sep;125(Pt 3):197-207. <https://doi.org/10.1017/s0031182002002081>
- Manna L, Corso R, Galiero G, Cerrone A, Muzj P, Gravino AE (2015) Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. Parasit Vectors Maio 28;8:289. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0896-0>
- Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE (2008) Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. Vet J. Aug;177(2):279-82. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.04.013>
- Marcondes M, Day MJ (2019) Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. Res Vet Sci. Apr;123:261-272. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>
- Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L (2011) Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. Parasit Vectors. Apr 13(4):57. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-57>
- Morales-Yuste M, Martín-Sánchez J, Corpas-Lopez V (2022) Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. Vet Sci. Jul 27;9(8):387. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080387>
- Nabity MB, Lees GE, Boggess MM, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Rakitin A, Aguiar J, Relford R (2015) Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. J Vet Intern Med. Jul-Aug;29(4):1036-44. <https://doi.org/10.1111/jvim.12835>
- Nogueira FS, Avino VC, Galvis-Ovallos F, Pereira-Chioccia VL, Moreira MAB, Romariz APPL, Molla LM, Menz I (2019) Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. Parasit Vectors. Feb 8;12(1):79. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3323-0>
- Oliveira KWD (2017) Utilização da PCR diagnóstica, imunohistoquímica e perfil epidemiológico de *Leishmania* em cães no município de Porto Nacional-TO (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). <https://doi.org/10.11606/T.85.2019.tde-05122018-100006>

- Ordeix L, Dalmau A, Osso M, Llull J, Montserrat-Sangrà S, Solano-Gallego L (2017) Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. *Parasit Vectors* 2017 Mar 13;10(1):121. [https://doi.org/10.1186/s13071-017](https://doi.org/10.1186/s13071-017-017)
- Papadogiannakis EI, Koutinas AF (2015) Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* Feb 15;163(3-4):94-102. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.011>
- Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Vlemmas J, Lekkas S, Karameris A, Fytianou A (2005) Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol.* Apr 8;104(3-4):227-37. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.12.001>
- Pfarr KM, Krome AK, Al-Obaidi I, Batchelor H, Vaillant M, Hoerauf A, Opoku NO, Kuesel AC (2023) The pipeline for drugs for control and elimination of neglected tropical diseases: 2. Oral anti-infective drugs and drug combinations for off-label use. *Parasit Vectors.* 2023 Oct 31;16(1):394. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05909-8>
- Prophet EB (1992) (Ed.). Laboratory methods in histotechnology. American Registry of Pathology
- Proverbio, D, Spada E, De Giorgi bg, Perego R (2014) Failure of Miltefosine Treatment in Two Dogs with Natural *Leishmania infantum* Infection. *Case Reports in Veterinary Medicine*, v. 2014, p. 1–6, <https://doi.org/10.1155/2014/640151>
- Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, da Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM (2009) Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop.* Sep;111(3):289-94. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.05.008>
- Rosário CJD, Dominici MF, Braga MDSC, Lima CA, Pereira JG, Melo FA (2018) Quantificação da IL-10 e do INF- γ em cães com ou sem sinais clínicos de infecção com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Pesq Vet Brasileira*, 38(1), 129-132
- Sambrook J, Russell DW, (2006) Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells using proteinase K and phenol. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2006, n. 1, p. pdb. prot4036
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* Oct 28;165(1-2):1-18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>
- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G (2011) The LeishVet Group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors.* May 20;4:86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
- Verçosa BL, Lemos CM, Mendonça IL, Silva SM, de Carvalho SM, Goto H, Costa FA (2008) Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res.* Nov 6;4:45. doi: 10.1186/1746-6148-4-45

WHO (2023) Leishmaniose. Disponível em: < Leishmaniasis (who.int) > em: 17 nov 2023

Woerly V, Maynard L, Sanquer A, Eun HM (2009) Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol Res.* Aug;105(2):463-9. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1404-2>

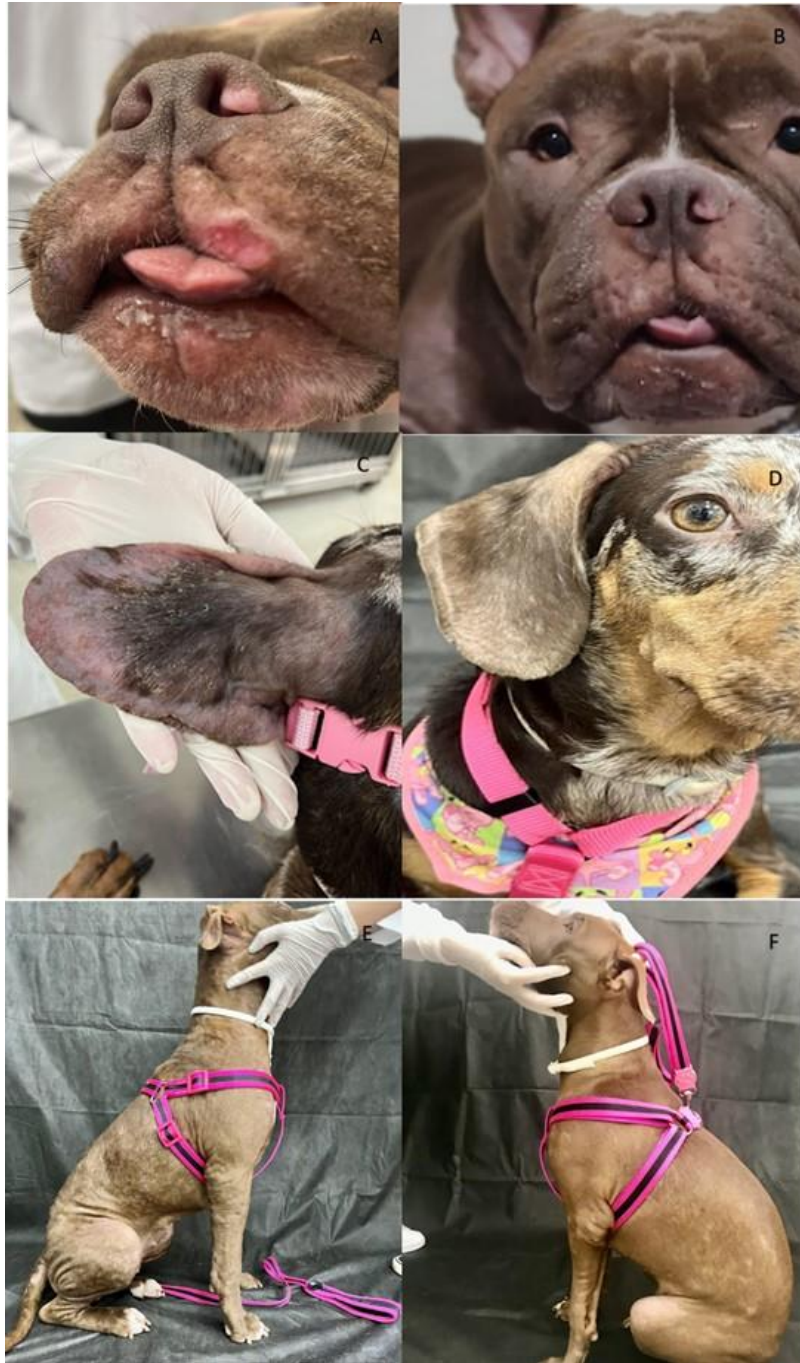


Fig 1 (A) Ulcerative dermatitis in a 3-year-old female dog with CanL before treatment (D0). (B) Remission of clinical signs after D150 of treatment with miltefosine and allopurinol. (C) Exfoliative dermatitis and alopecia in the ear of an 8-month-old female dog before treatment with miltefosine and allopurinol. (D) Remission of clinical signs after D150 of treatment. (E) Exfoliative dermatitis and areas of hypotrichosis/alopecia in a female dog, 8 months old, before treatment with miltefosine and allopurinol. (F) Slight alopecia on the edges of the pinna of the same dog after D150 of treatment. (G) Exfoliative dermatitis, hyperkeratosis and areas of hypotrichosis/alopecia in a 10-month-old female dog before treatment with miltefosine and allopurinol. (H) Mild periocular alopecia of the same dog after D150 of treatment

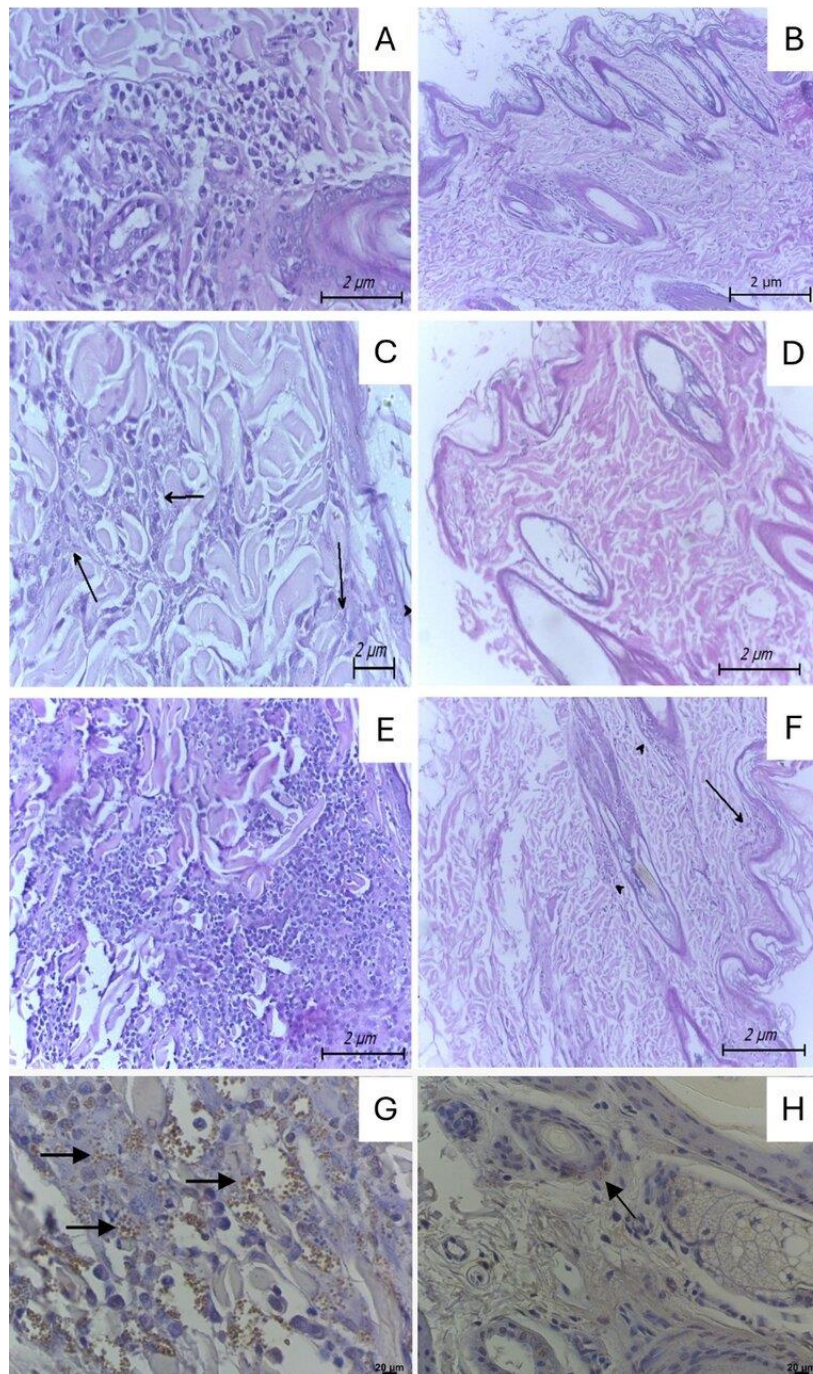


Fig 2 Skin. Perivascular inflammatory infiltrate composed of macrophages in the dermis of a dog with CVL on D0. HE, Obj 40x. (A). An improvement in inflammation is noted 150 days after treatment. HE, Obj 20x. (B). Amastigote forms of *L. infantum* dispersed in the interstitium of dog dermis on D0. HE, Obj 40x. (W). No presence of amastigotes was observed in the skin of the same canine with CVL after D150 of treatment. HE, Obj 10x. (D). Marked inflammatory infiltrate interstitial composed of macrophages and lymphocytes in a dog with CVL on D0. HE, Obj 40x. (E). Presence of a mild inflammatory infiltrate composed of macrophages in the dermis of the same dog (arrows). Showing a decrease in inflammation after 150 days of treatment (F). HE, Obj 20x. Immunostaining of amastigotes in dog skin at D0 (G). Decrease in amastigote forms from the same dog at D150 (H). Obj 65x.

Table 1 Mean values, standard deviation of hematological, biochemical, urinary parameters and parasitic load of dogs with CanL before (D0) and after (D150) treatment with miltefosine and allopurinol

Variables (Reference range)	D0	D150	Valor p
Erythrocytes (5.5-8.5 x10 ⁶ /ul)	4.80	6.02	<0.001
Hemoglobin (12-18 g/dL)	9.91	13.16	0.002
Hematocrit (37-55%)	31.70	40.23	0.004
Total Leukocytes (6-17 x10 ³ /ul)	7.94	8.1	0.938
Platelets (200-500 x10 ³ /ul)	203.35	247.00	0.526
Urea (21 – 59,9)	41.58	50.64	0.230
Creatinine (0,5 – 1,5 mg/dL)	0.94	1.14	0.012
Seric protein (5,4-7,1 g/dL)	9.65	8.42	0.012
Albumin (2,6 – 3,3 g/dL)	2.37	3.01	0.004
Globulin (2,7 – 4,4 g/dL)	7.28	5.41	0.006
A:G ratio (0.59 – 1.1)	0.38	0.65	0.004
ALT (21 – 102)	38.05	60.64	<0.001
ALP (20 – 156)	113.11	69.47	0.004
USG (1015 – 1045)	1030.82	1035.94	0.210
UPC (<0,2)	0.982	0.534	0.300
Parasitic load ^a	5.767	4.782	0.008
Clinical score	12.47	3.58	<0.001

*ALT alanine aminotransferase, ALP alkaline phosphatase, USG urine specific gravity, UPC urinary protein:creatinine

^a number of copies (10¹⁰)/μl

APÊNDICE D – Qualis da revista

Título:
☒ Parasitology Research

Classificação:
☒ A1

[Consultar](#) [Cancelar](#)

Periódicos

ISSN	Título	Área com publicação no quadriênio	Classificação	Área mãe
1432-1955	PARASITOLOGY RESEARCH (1987. INTERNET)	MEDICINA VETERINÁRIA	A1	MEDICINA VETERINÁRIA
0932-0113	PARASITOLOGY RESEARCH (1987. PRINT)	MEDICINA VETERINÁRIA	A1	MEDICINA VETERINÁRIA

[Início](#) [Anterior](#) [1](#) [Próxima](#) [Fim](#)

1 a 0 de 0 registro(s)

Compatibilidade
  

Versão do sistema: 3.77.0 Copyright 2022 Capes. Todos os direitos reservados.

APÊNDICE E – Comprovante de Submissão

