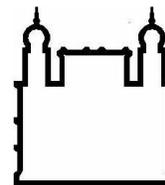




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA E CLÍNICA DO USO DE
DIETILDITIOCARBAMATO (DETC) NO TRATAMENTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NATURAL E EXPERIMENTAL**

KLEVERTON RIBEIRO DA SILVA

Salvador – Bahia

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA E CLÍNICA DO USO DE
DIETILDITIOCARBAMATO (DETC) NO TRATAMENTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NATURAL E EXPERIMENTAL**

KLEVERTON RIBEIRO DA SILVA

Orientadora: Prof^a Dr^a Aldina Barral

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Khouri

Tese apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Patologia
para a obtenção do grau de Doutor

Salvador – Bahia

2016

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S586a Silva, Kleverton Ribeiro da.
Avaliação hematológica, bioquímica e clínica do uso de dietilditiocarbamato (DETC) no tratamento *in vitro* e *in vivo* da leishmaniose visceral canina natural e experimental. / Kleverton Ribeiro da Silva. - 2016.
177 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof^a Dr^a Aldina Barral, Laboratório de Imunoparasitologia.
Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação
Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2016.

1. Leishmaniose visceral. 2. Cão. 3. Dietilditiocarbamato. 4. Clínica. I. Título.

CDU 616.993.161

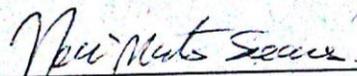
Título da Tese: "AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA E CLÍNICA DO USO DE DIETILDITIOCARBAMATO (DETC) NO TRATAMENTO IN VITRO E IN VIVO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NATURAL E EXPERIMENTAL."

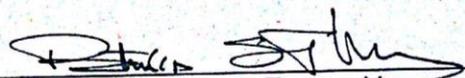
KLEVERTON RIBEIRO DA SILVA

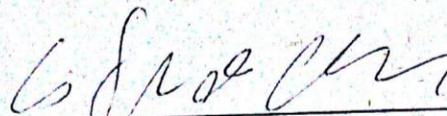
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 24 de outubro de 2016

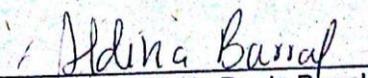
COMISSÃO EXAMINADORA


Dra. Neci Matos Soares
Professora Titular
UFBA


Dra. Patricia Sampaio Tavares Veras
Pesquisadora Titular
IGM/ Fiocruz


Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Pesquisador
IGM/Fiocruz


Dr. Thiago Marconi de Souza Cardoso
Pesquisador
IGM/Fiocruz


Dra. Aldina Maria Prado Barral
Pesquisadora Titular
IGM/Fiocruz

FONTES DE FINANCIAMENTO

FAPESB

FIOCRUZ

CAPES

DEDICATÓRIA

À Deus pela dádiva da vida e por me acompanhar sempre nos momentos difíceis e felizes.

Aos meus pais “DONA RAIMUNDA” e “JOSÉ DE CASTRO” que sempre primaram pela minha educação, além de me oferecerem a oportunidade de estudar, estando sempre presentes e sou muito feliz por isso

A todos que já perderam um “companheiro de quatro patas” para essa doença triste e deplorável

Aos animais que perderam a vida durante a realização do estudo, não foi em vão.

À minha família, meus amigos e minha namorada pela carinho, paciência e incentivo. Por sempre me darem força, me apoiarem em todos os momentos e por serem o motivo pelo qual consigo continuar lutando.

Eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ–BA) por disponibilizar toda sua incrível estrutura, pelo interesse nesse estudo e por oferecer cursos de pós-graduação de excelente qualidade.

Ao Centro de Controle de Zoonoses (FMS/PMT), Hospital Veterinário Universitário (HVU-UFPI) e ao Laboratório de Sanidade Animal (LASAN–UFPI) pelo apoio e confiança no estudo, assim como dedicação dos funcionários sempre que lhe foram solicitados.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia (PgPAT/FIOCRUZ-BA) e todos os funcionários pelo profissionalismo e apoio no decorrer do curso.

À Dra Aldina Barral pela orientação, confiança, e oportunidade de aprender um novo mundo dentro da ciência.

Ao Dr Ricardo Khouri pelo companheirismo, amizade, incentivo, comprometimento, pela ajuda desde o desenho dos estudos até sua concepção, por não poupar trabalho e empenho para que o resultado de todos os esforços seja um trabalho de qualidade à altura dessa instituição.

À Prof^a Dra Maria do Socorro Pires e Cruz pela coordenação dos ensaios na área endêmica (Teresina/PI), auxílio no desenvolvimento dos experimentos e pela amizade.

Aos amigos Kiyoshi Fukutani e Jukeline Cristal pela ajuda imprescindível no desenvolvimento do trabalho em Salvador.

Aos amigos do LASAN, Thiago, Kellen, Leopoldo, Luana, Aryclene e Sr. Francisco pela ajuda essencial nos experimentos realizado em Teresina.

A Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna do Instituto Gonçalo Moniz

A todos os colegas e professores da pós-graduação em Patologia pelo convívio e aprendizado.

Aos colegas do LIMl e LIP com os quais criei não apenas vínculos de trabalho, mas verdadeiras amizades

E a todos aqueles, cujos nomes eu não tenha citado e tenham colaborado direta ou indiretamente para a realização desse sonho.

MEU MUITO OBRIGADO!!!

“Para quem tem pensamento forte, o impossível é só questão de opinião!!!”

Alexandre Abrão

SILVA, Kleverton Ribeiro da. Avaliação hematológica, bioquímica e clínica do uso de dietilditiocarbamato (DETC) no tratamento *in vitro* e *in vivo* da leishmaniose visceral canina natural e experimental. 179f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, e tem o cão como reservatório doméstico. Nessa espécie, a leishmaniose visceral canina (LVC) é caracterizada por um amplo espectro de sinais clínicos, variando de acordo com a resposta imune do animal parasitado, o que dificulta o seu diagnóstico. Na busca de um tratamento eficaz, os cães são submetidos a vários agentes terapêuticos e protocolos. Embora alguns protocolos resultem em melhora dos sinais clínicos, as recidivas são frequentes. Além disso, a detecção do parasito na pele dos cães tratados faz com que sua participação no ciclo de transmissão continue, inclusive com risco de infecção de humanos e seleção de cepas resistentes às drogas de referência. Um dos fármacos que já demonstraram ação contra a *Leishmania* é o Dietilditiocarbamato (DETC), um potente inibidor de Superóxido Dismutase (SOD), enzima que atua facilitando a sobrevivência de parasitos intracelulares. **OBJETIVO:** Os objetivos deste estudo foram testar o DETC, *in vitro* e *in vivo*, para o tratamento contra LVC e desenvolver um algoritmo que auxilie no diagnóstico clínico da doença. **MÉTODOS:** Nos ensaios *in vitro* foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico de cães saudáveis. Nos ensaios *in vivo* foram utilizados 10 cães experimentalmente infectados e 16 naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Para o algoritmo foram realizados testes sorológicos e avaliação clínica em 443 cães de Teresina (PI). **RESULTADOS:** Os resultados *in vitro* demonstraram que o fármaco possui baixa toxicidade e foi capaz de induzir o parasito à morte por mecanismo semelhante ao encontrado em outros estudos. Nos ensaios com animais experimentalmente infectados o DETC diminuiu a carga parasitária ($p=0.0009$) e diminuiu os níveis de alanina aminotransferase ($p=0.0013$). Os testes com cães naturalmente infectados demonstraram que o DETC foi capaz de provocar uma melhora clínica maior que a provocada observada pelo tratamento com Alopurinol. Poucas mudanças nos parâmetros laboratoriais foram vistas nos ensaios *in vivo*, mostrando a baixa toxicidade da administração do DETC. O algoritmo demonstrou grande interação entre os sinais clínicos, e alguns como onicogribose, despigmentação de focinho ou ceratoconjuntivite ($P < 0.001$) foram altamente associados com LVC. **CONCLUSÕES:** O DETC mostrou baixa toxicidade nos modelos *in vitro* e *in vivo*, não levou a alterações hematológicas e bioquímicas prejudiciais em nenhum dos dois modelos e diminuiu a carga parasitária e o escore clínico em modelo experimental e natural da LVC, respectivamente. O algoritmo baseado em sinais clínicos para o diagnóstico de LVC podem ajudar os veterinários a fazer uma identificação confiável de cães com LVC em áreas endêmicas.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, cão, Dietilditiocarbamato, Clínica

SILVA, Kleverton Ribeiro da. Hematological, biochemistry and clinical evaluation of the use of Diethyldithiocarbamate (DETC) in treatment *in vitro* and *in vivo* of canine visceral leishmaniasis natural and experimental. 179f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Visceral Leishmaniasis (VL) is a zoonosis caused by *Leishmania infantum*, and has the dog as domestic reservoir. In this species, canine visceral leishmaniasis (CVL) is characterized by a broad spectrum of clinical signs, varying with the immune response of parasitized animals, which complicates the diagnosis. In the search for an effective treatment, the dogs are subjected to various therapeutic agents and protocols. Although some protocols result in improvement of clinical signs, recurrences are frequent. Furthermore, the detection of the parasite in the skin of treated dogs makes participation in the transmission cycle to continue, including the risk of human infection and selection of resistant strains to the reference drugs. One of drugs that have shown activity against *Leishmania* is diethyldithiocarbamate (DETC), a potent inhibitor of superoxide dismutase (SOD), an enzyme that acts facilitating survival of intracellular parasites. **AIM:** This study aimed to test the DETC, *in vitro* and *in vivo* for the treatment against LVC and develop an algorithm to assist in clinical diagnosis of disease. **METHODS:** *In vitro* tests Mononuclear cells from peripheral blood of healthy dogs were used. To *in vivo* assays were used 10 experimentally infected dogs and 16 naturally infected with *Leishmania infantum*. For the algorithm were performed serologic tests and clinical evaluation in 443 dogs of Teresina (PI). **RESULTS:** *In vitro* results showed that the drug has low toxicity and is capable of inducing parasite death by mechanism similar to that observed in other studies. In tests with animals experimentally infected the DETC decreased parasite load ($p = 0.0009$) and decreased alanine aminotransferase levels ($p = 0.0013$). Tests on naturally infected dogs have shown that DETC was able to cause a greater clinical improvement observed that brought about by treatment with Allopurinol. Few changes in laboratory parameters were seen in *in vivo* tests showing low toxicity administration of DETC. The algorithm showed great interaction between the clinical signs, and some as onychogryphosis, muzzle depigmentation or keratoconjunctivitis ($P < 0.001$) were highly associated with LVC. **CONCLUSIONS:** The DETC showed low toxicity in models *in vitro* and *in vivo*, did not lead to hematological and biochemical changes harmful in any of two models and decreased parasite load and clinical score in experimental and natural model of LVC, respectively. The algorithm based on clinical signs for the diagnosis of LVC can help veterinarians to make a reliable identification of dogs in endemic areas with CVL.

Key words: Visceral leishmaniasis, Dog, Diethyldithiocarbamate, Clinical

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO I

Figura 1	Estudo da toxicidade de diferentes concentrações do DETC sobre <i>Leishmania infantum</i> e células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães saudáveis.....	45
Figura 2	Atividade do DETC sobre <i>Leishmania infantum</i> e produção de óxido nítrico (NO) e superóxido (O ₂ ⁻) por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães saudáveis.....	46
Figura 3	Carga parasitária em aspirado de linfonodo associada a níveis plasmáticos de atividade de SOD de dez cães com LVC experimental antes, durante e após o tratamento com DETC (A) e escore clínico dos animais nestes três tempos do estudo (B).....	51
Figura 4	Variáveis hematológicas e bioquímicas de dez cães com LVC experimental antes, durante e após o tratamento com DETC.....	52

ARTIGO II

Figura 1	Parâmetros avaliados antes serem submetidos ao tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia) de oito cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i>	78
Figura 2	Parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) serem submetidos ao tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia), de oito cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i>	79
Figura 3	Carga parasitária no aspirado de linfonodo de oito cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> , antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) serem submetidos ao tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia).....	80
Figura 4	Influência do tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia) no escore clínico de oito cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i>	82
Figura 5	Sobrevivência de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> após tratamento DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia).....	84
Figura suplementar 1	Parâmetros hematológicos e bioquímicos de oito cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> avaliados antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) serem submetidos ao tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia).....	99-101
Figura	Parâmetros hematológicos e bioquímicos de oito cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> avaliados antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) serem submetidos ao	

suplementar 2	tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) (gráficos da coluna da esquerda) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia) (gráficos da coluna da direita).....	102-106
----------------------	---	---------

ARTIGO III

Figura 1	Canine Visceral Leishmaniasis diagnostic tests and clinical signs. ELISA, smear and culture for CVL were performed for all dogs brought for health care to a reference veterinary hospital in the endemic area (A). Total signs score (range 0-19) were higher in subjects with positive ELISA, culture, slide and for the combinations of ELISA+culture or ELISA+slide (B).....	130
Figura 2	Heat map analysis of all sick dogs. Fourteen different signs were evaluated according to the proposed clinical score, and a two-way hierarchical cluster analysis (Ward's method) was done to look for patterns of associations between diferente signs for all dogs.....	131
Figura 3	Networking the clinical signs of dogs with visceral leishmaniasis. The network analysis (interactome) shows statistically significant correlations ($P < 0.05$) between all the signs recorded for all sick dogs (A) and dogs positive for CVL (C).....	132
Figura 4	Heat map analysis of dog clinical signs according to CVL 33 status. Two-way hierarchical cluster analysis (Ward's method) was done to look for patterns of associations between different signs for CVL negative dogs (A) and CVL positive dogs (B).....	133
Figura 5	Association of clinical signs and clinical scores with CVL.....	134

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1	Sinais clínicos de dez cães experimentalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> antes, durante e depois do tratamento com 100mg/Kg/dia DETC.	49
Tabela 2	Valores médios das variáveis hematológicas e bioquímicas de dez cães infectados experimentalmente com <i>Leishmania infantum</i> antes, durante e após o tratamento com DETC.....	50

ARTIGO II

Tabela 1	Perfil com avaliação hematológica, bioquímica, clínica e carga parasitária de oito cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> antes (dia 0) e durante (dias 15 e 30) o tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia).....	76/77
Tabela 2	Resultado de testes sorológicos e parasitológicos após o tratamento com DETC ou Alopurinol de oito cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i>	85
Tabela suplementar 1	Avaliação clínica de oito cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) serem submetidos ao tratamento com 50mg/Kg/dia DETC ou 20mg/Kg/dia.....	108

ARTIGO III

Tabela 1	Baseline characteristics of sick dogs recruited in this study.....	135
Tabela 2	Frequency of clinical signs in dogs with visceral leishmaniasis, ehrlichiosis and without CVL.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Amino Transferase
BALB/c	Camundongo albino
BOD	Estufa com demanda biológica de oxigênio
COBEA	Brazilian College of Animal Experimentation
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DETC	Dietilditiocarbamato
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DPP	Dual Path Platform – Teste imunocromatográfico rápido
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio imunoenzimático
FMS	Fundação Municipal de Saúde
GEZOON	Gerência de Zoonoses de Teresina
H₂O₂	Peróxido de oxigênio
IFN-γ	Interferon gama
IgG1	Imunoglobulina G tipo 1
IL-10	Interleucina tipo 10
IL-2	Interleucina tipo 2
IL-4	Interleucina tipo 4
LIP	Laboratório de Imunoparasitologia
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LVH	Leishmaniose visceral humana
MS	Ministério da Saúde
O₂⁻	Ânion superóxido
OH⁻	Radical hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
RNA	Ácido Ribonucleico

ROC	Receiver operator characteristic
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio – SDS
SEM	Standard error of the mean – Erro padrão da média
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SOD	Superóxido Dismutase
Th1	Células T helper tipo 1
Th2	Células T helper tipo 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
U/mL	Unidades por mililitros

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A DOENÇA VISCERAL HUMANA	18
1.2 A DOENÇA VISCERAL CANINA.....	19
1.3 EUTANÁSIA DOS CÃES INFECTADOS COMO MEDIDA DE CONTROLE E PREVENÇÃO.....	20
1.4 TRATAMENTO DA LVC.....	22
1.5 DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS TERAPIAS	24
1.6 DETC COMO ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DA LVC.....	25
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	28
3 OBJETIVOS	30
4 DESENHO EXPERIMENTAL	31
5 CAPÍTULO I	
AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DA TERAPIA COM DIETILDITIOCARBAMATO (DETC) EM CÃES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM <i>Leishmania infantum</i>.....	34
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
5.1 INTRODUÇÃO.....	36
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.3 RESULTADOS	44
5.4 DISCUSSÃO	53
5.5 REFERÊNCIAS	58
5.6 APÊNDICE 1.....	63
6 CAPÍTULO II	
TRATAMENTO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> COM DIETILDITIOCARBAMATO (DETC)	65
RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
6.1 INTRODUÇÃO.....	67
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
6.3 RESULTADOS.....	74
6.4 DISCUSSÃO.....	86
6.5 REFERÊNCIAS.....	89
6.6 MATERIAL SUPLEMENTAR.....	99
7...CAPÍTULO III	
SCORING CLINICAL SIGNS CAN HELP DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN A HIGHLY ENDEMIC AREA IN BRAZIL	110
SUMMARY	111
7.1 INTRODUCTION.....	112
7.2 MATERIALS AND METHODS.....	113
7.3 RESULTS.....	117
7.4 DISCUSSION.....	121
7.5 ACKNOWLEDGMENTS.....	125
7.6 REFERENCES.....	126
7.7 FIGURES.....	130
7.8 TABLES.....	135

8	DISCUSSÃO.....	137
9	CONCLUSÕES.....	147
10	REFERÊNCIAS.....	148

1. INTRODUÇÃO

Dentre as moléstias ou enfermidades que assolam a humanidade, as doenças causadas por parasitos são um dos principais problemas de saúde pública, principalmente nos países que possuem precárias condições sanitárias e de saúde (BRASIL, 2014; CDC, 2015; WELBURN *et al.*, 2015). Dentre essas enfermidades causados por parasitos, a leishmaniose ocupa um lugar de destaque. Trata-se de um complexo de doenças que se distribui por vários continentes, principalmente no asiático, africano e americano. Está presente em mais de 90 países, com um número de casos incidentes anuais em torno de 1,6 milhão (MURRAY *et al.*, 2005; ALVAR; DESJEUX, 2012).

De uma maneira geral, as leishmanioses dividem-se clinicamente em dois grupos: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) (LAINSON; SHAW, 2006; BRASIL, 2014). A forma tegumentar da doença é amplamente distribuída no mundo e os 10 países com o maior número de casos são Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru. Juntos, esses países respondem por 70 a 75% da incidência global estimada da leishmaniose cutânea. Já a forma visceral é mais restrita e 90% dos casos que ocorrem no mundo acontece em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. Embora as informações não sejam minuciosamente apuradas em alguns países, estima-se que o número de óbitos provocados pela doença fique em torno de 30.000 mortes por ano (BERMAN, 2006; ALVAR; DESJEUX, 2012; SAVOIA, 2015).

A leishmaniose visceral ou calazar, foco principal desta tese, é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) e transmitida por insetos da família flebotominae. No Brasil, a espécie causadora da LV é a *Leishmania infantum* (Similar a *L. chagasi*) e os vetores são fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (OLIVEIRA; FALCÃO; BRAZIL, 2000; SILVA, *et al.*, 2007). Quando os vetores infectados realizam o repasto sanguíneo, formas promastigotas metacíclicas (forma infectante) são inoculadas na pele dos hospedeiros, sendo rapidamente fagocitadas por macrófagos e neutrófilos (CASSATELLA *et al.*, 2006). Dentro dessas células os parasitos se diferenciam para a forma amastigota, se

multiplicam e são disseminados pelas células mononucleares periféricas para vários órgãos como medula óssea, baço, fígado e linfonodo (SANTOS-GOMES; CAMPINO; ABRANCHES, 2000; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2003). A intensa multiplicação assexuada dos parasitos culmina no rompimento das células hospedeiras, libertando os parasitos para serem fagocitados por outras células e, conseqüentemente, transformando o hospedeiro em uma fonte de infecção (HANDMAN, 2000).

No Brasil, a LV surgiu como uma doença que ocorria no meio rural, onde mantinha um ciclo silvestre, infectando raposas, roedores e marsupiais (CURI *et al.*, 2006; LUPPI *et al.*, 2008). Após o desenvolvimento ocorrido entre as décadas de 70 e 80, houve um processo de urbanização da doença e o surgimento de casos no homem e no cão impulsionado por fatores como crescimento desordenado das cidades, desmatamentos, pessoas vivendo em condições precárias de saúde e sanidade, destruição do habitat natural do vetor e infecção de animais domésticos (cães, gatos, equinos) (ASHFORD, 2000; COURTENAY, 2002; COSTA *et al.*, 2005; WERNECK *et al.*, 2007).

1.1 A DOENÇA VISCERAL HUMANA

Nos últimos 20 anos a leishmaniose visceral humana (LVH) tem aumentado sua importância no Brasil, com ocorrência de casos graves de LVH em crianças, idosos e indivíduos infectados com HIV-1 (ALVAR *et al.*, 1997; ABDELMOULA *et al.*, 2003; ALVAR *et al.*, 2008; BARRETO-DE-SOUZA *et al.*, 2006; TÁVORA; NOGUEIRA; GOMES 2015). Dados recentes demonstram que a incidência e a prevalência da LV são de aproximadamente 7% para ambos os índices na população brasileira (BRASIL, 2006; BRASIL, 2014).

Na maioria dos casos humanos a infecção não resulta na apresentação de sinais clínicos da doença (assintomáticos). Contudo, quando as manifestações clínicas ocorrem, elas possuem caráter crônico, com aumento e comprometimento de órgãos como fígado, baço e linfonodos, não sendo incomum a ocorrência de óbitos (OLIVEIRA *et al.*, 2010; BRASIL, 2014). De uma maneira sucinta, os sinais clínicos apresentados pelos pacientes com LV são febre, emagrecimento, hepatoesplenomegalia e palidez (PASTORINO *et al.*, 2002). Os pacientes apresentam resultados positivos em testes sorológicos e/ou parasitológicos. As alterações laboratoriais sugestivas da doença

incluem anemia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, queda no número de neutrófilos, eosinófilos e na relação albumina/globulina. Acréscimo nos níveis das enzimas hepáticas e renais, juntamente com quadros hemorrágicos são observados com menor frequência (SILVA, *et al.*, 2001; BARANWAL; MANDAL; SINGH, 2007).

Apesar de não estarem bem esclarecidos os motivos pelos quais apenas alguns pacientes infectados evoluem para a LV, a resposta imune do hospedeiro é implicada como um dos fatores mais importantes (NÝLEN; SACKS, 2007). A resposta imune do tipo Th1, com produção das citocinas IL-2 e IFN- γ , está relacionada com os casos assintomáticos. Já a resposta tipo Th2, com produção de citocinas IL-4 e IL-10, induz a evolução para doença polissintomática com a produção descontrolada de anticorpos, formação de imunocomplexos, e inibição da capacidade leishmanicida das células fagocíticas (RIBEIRO-DE-JESUS, *et al.*, 1998; KHOSHDEL *et al.*, 2009).

No tratamento de casos humanos de LV, o protocolo terapêutico de primeira escolha indicado pelo Ministério da Saúde (20mg de Sb+5/Kg/dia administrados por via endovenosa ou intramuscular, não superando 850mg, por 20-40 dias) possui índice de cura superior a 90% (HERWALDT *et al.*, 1992; JERONIMO *et al.*, 1994). Quando ocorre uma falha do tratamento com glucantime, são utilizados fármacos de segunda escolha com sucesso, como a desoxicolato de anfotericina B, a anfotericina B lipossomal (THAKUR *et al.*, 1993; SINGH *et al.*, 2010; BERMAN *et al.*, 1998), alopurinol em associação com outros fármacos (RAGUSA *et al.*, 1993; TORRUS *et al.*, 1996) e a miltefosine (PEREZ-VICTORIA; CASTANYS; GAMARRO, *et al.*, 2003; PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006; RAHMAN *et al.*, 2011; RIJAL *et al.*, 2013). Caso não seja tratada a LVH poderá evoluir e até levar ao óbito.

1.2 A DOENÇA VISCERAL CANINA

A leishmaniose visceral canina (LVC) é altamente prevalente nos países da América Latina, principalmente no Brasil (TESH, 1995; BRASIL, 2014). Na LVC, os parasitos acabam se distribuindo por vários órgãos e tecidos do corpo dos animais, com detecção de parasitos na medula, baço, fígado, linfonodo e pele (MANNA *et al.*, 2004), levando a manifestações clínicas variadas (REIS *et al.*, 2006). Os animais podem apresentar desde apatia, febre, hemorragias generalizadas e edemas de membros, até

dermatite esfoliativa, despigmentação no focinho e lábio, úlceras na pele, ceratoconjuntivite e onicogribose (CIARAMELLA *et al.*, 1997; ALVAR *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2006; DE FREITAS, *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2014). Algumas alterações bioquímicas e hematológicas como anemia normocítica e normocrômica, trombocitopenia, leucopenia, aumento das proteínas totais do soro e aumento dos níveis de ureia e alanina amino transferase (ALT) também são observadas frequentemente na LVC (SLAPPENDEL *et al.*, 1988; LISTE-BURILLO *et al.*, 1994; AMUSATEGUI *et al.*, 2003; COSTA-VAL *et al.*, 2007; FREITAS, *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de sinais clínicos nos cães também está associado à resposta imune Th2 (IL-4 e IL-10), com alterações nos órgãos linfoides, principalmente com uma diminuição das regiões ricas em células T e uma proliferação nas áreas com predominância de células B (PINELLI *et al.*, 1994; LEANDRO *et al.*, 2001; RODRIGUES, *et al.*, 2009). Estas alterações têm como consequência o aumento e/ou mudança conformacional de órgãos como fígado, baço e linfonodo (SANTANA *et al.*, 2007; STRAUSS-AYALI; BANETH; JAFFE, *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2014). Além do mais, o aumento e a ativação de células B promove a produção descontrolada de imunoglobulinas, que podem formar imunocomplexos com os antígenos do parasito, contribuindo para o desenvolvimento de uveíte, poliartrite e glomerulonefrite (LOPEZ, LUCENA, NOVALEZ, *et al.*, 1996; COSTA *et al.*, 2010; DE FREITAS, *et al.*, 2012; PROVERBIO, *et al.*, 2014).

Na doença canina, a maioria dos fármacos disponíveis para tratar a LVH provocam apenas uma melhora clínica transitória dos animais, mas nenhum elimina a infecção de forma definitiva (MIRÓ *et al.*, 2008). Esse fato atribui aos cães um papel central de reservatório urbano do parasito, alimentando o ciclo da doença e contribuindo sobremaneira para os casos de LVH (TRAVI *et al.*, 2002; ALVAR *et al.*, 2004; BANETH; AROCH, 2008; SOARES, *et al.*, 2011).

1.3 EUTANÁSIA DOS CÃES INFECTADOS COMO MEDIDA DE CONTROLE E PREVENÇÃO

A proximidade com cães doentes com LV foi relatada como um dos condicionantes para a manutenção da transmissão da doença humana em diversos trabalhos (OLIVEIRA, *et al.*, 2001; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001; BORGES *et al.*, 2009; WERNECK *et al.*, 2006; FRAGA *et al.*, 2012). Assim, medidas de controle e combate mais eficazes são elaboradas levando em consideração a eliminação dos reservatórios domésticos para diminuir a incidência de novos casos de LVH (BRASIL, 2014).

A eliminação dos reservatórios domésticos consiste basicamente na eutanásia de cães sorologicamente e/ou parasitologicamente positivos. Porém, os resultados dos estudos realizados sobre a eficiência desta medida no combate a LV são conflitantes (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2016). Existem diversos estudos que demonstram o sucesso desta medida. Palatnik-de-sousa *et al.*, (2001) demonstraram que a diminuição da eutanásia de cães provocou um aumento no surgimento de casos humanos da LV em Minas Gerais. Além disso, estudo baseado em modelo matemático mostrou que a eutanásia de cães positivos pode levar a uma redução de mais de 80% na ocorrência de casos humanos e de quase 60% de casos caninos (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2004), hipótese sustentada também por outros pesquisadores (BRAGA *et al.*, 1998; COSTA; TAPETY; WERNECK, 2007; NUNES *et al.*, 2010). Por outro lado, alguns trabalhos evidenciam que a eutanásia de cães positivos não diminui a incidência de casos novos de LV (EVANS *et al.*, 1992; ARAGÃO; DOURADO; PACHECO, 2008; DRUMOND; COSTA, 2011). Um dos autores, inclusive, considerou como decepcionante esta medida, pois não foi observada diferença estatística da incidência de casos de LVH quando se comparou uma área que foi adotada a eutanásia de cães e outra área sem o uso dessa medida (DIETZE *et al.*, 1997).

O controle da LV é complexo e dificultado por suas características multifatoriais, envolvendo características ambientais, dos hospedeiros, dos vetores e dos agentes etiológicos (ALVAR; DESJEUX, 2012; GONZÁLEZ *et al.*, 2015). Assim, alguns autores defendem que é necessária a combinação de estratégias para serem realmente efetivas, associando a eutanásia de cães com outras medidas de controle (MORENO, ALVAR, 2002; VERÇOSA *et al.*, 2008; BRASIL, 2014). Entre estas medidas alternativas de controle estão a utilização de repelentes, telas nas portas das residências e evitar ambientes e horários onde o vetor possa ser encontrado pelo homem (GONZÁLEZ *et al.*,

2015). Adicionalmente, é indicado adotar o uso de coleiras impregnadas com o repelente Deltametrina 4%, para os cães (CAMARGO-NEVES; RODAS; JÚNIOR, 2004), o manejo sanitário correto do lixo para que se evite o acúmulo de matéria orgânica favorável para o desenvolvimento do vetor e a utilização de inseticidas de ação residual, como a cipermetrina e a deltametrina, que elimina a fase adulta dos flebotomíneos (DYE, 1996; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2003).

1.4 TRATAMENTO DA LVC

Como alternativa à eutanásia, o tratamento dos hospedeiros domésticos pode ser uma forma de interromper o ciclo de transmissão de uma maneira menos drástica (TRAVI, 2014). Pois, apesar de ainda não ser possível curar os cães tratados, é possível, muitas vezes, reduzir significativamente a carga parasitária, ainda que temporariamente (GHARBI *et al.*, 2015).

A terapia da LVC com antimoniato (100mg/kg a cada 24 horas, durante 3 ou 4 semanas) proporciona uma melhora clínica significativa com redução da carga parasitária (BANETH; SHAW, 2002; NOLI; AUXILIA, 2005; KASZAK; PLANELLAS; DWORECKA-KASZAK, 2015). Contudo, com a suspensão da terapia, os animais apresentam recidivas clínicas, com positividade em testes diagnósticos e parasitológicos (IKEDA-GARCIA *et al.*, 2007; IKEDA-GARCIA *et al.*, 2008). A implementação de alternativas para melhorar a absorção e distribuição em órgãos como fígado e baço do antimoniato, como o uso de adjuvantes, formulações lipossomais e/ou diminuição do tamanho das partículas, não foi capaz de melhorar significativamente o sucesso dessa terapia (SCHETTINI *et al.*, 2003; SCHETTINI *et al.*, 2006; JAMSHIDI *et al.*, 2011).

A terapia com alopurinol é capaz de reduzir a carga parasitária e melhorar as condições clínicas, normalizando parâmetros hematológicos e bioquímicos (resolução da anemia, aumento da relação albumina/globulina e restabelecimento dos níveis de células T CD4+) (KOUTINAS *et al.*, 2001; PAPADOGIANNAKIS *et al.*, 2010). Este fármaco apresenta uma grande vantagem em relação ao antimoniato, podendo ser utilizado por longos períodos (MANNA *et al.*, 2008a; BORJA-CABRERA *et al.*, 2010). Contudo, foi recentemente demonstrado a seleção de cepas resistentes ao tratamento com alopurinol (YASUR-LANDAU *et al.*, 2016).

A anfotericina B foi testada em cães com LVC na forma convencional e em formulações lipossomais. Em ambos os casos o fármaco promove uma redução significativa das manifestações clínicas, diminuição da carga parasitária e dos níveis de anticorpos. Porém, a melhora clínica com anfotericina B é também transitória e pode causar lesões renais graves (OLIVA *et al.*, 1995; WALKER *et al.*, 1998; CORTADELLAS, 2003; MIRÓ *et al.*, 2008).

Outros fármacos têm sido utilizados no tratamento da LVC em alguns ensaios com número reduzido de animais, como a miltefosina, a aminosidina, a domperidone, a enrofloxacina, o peptídeo sintético Oct-CA (1-7)M(2-9), o Trifluralin e a buparvaquona. Em geral, estes fármacos sustentaram a melhora clínica duradoura em alguns casos (mais de quatro anos), diminuíram os títulos de anticorpos, melhoraram as lesões de pele, reduziram a parasitemia e normalizaram alguns parâmetros laboratoriais. Contudo, a maioria desses fármacos apresentou alta toxicidade, recidivas constantes e presença contínua do parasito (VEXENAT *et al.*, 1998; ALBEROLA *et al.*, 2004; BIANCIARDI *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2008; GÓMEZ-OCHOA *et al.*, 2009; WOERLY *et al.*, 2009).

Além das monoterapias, diversas combinações foram testadas como terapia para LVC. A associação do antimoniato com o alopurinol diminuiu significativamente a carga parasitária e adiou as recidivas por até 24 meses (JOÃO *et al.*, 2006; PENNISI *et al.*, 2008; MANNA *et al.*, 2008b). A miltefosine, testada em associação com o antimoniato de meglumine e o alopurinol, levou a uma melhora clínica, influenciando inclusive na resposta imune celular dos animais, apesar da presença constante do DNA do parasito principalmente no linfonodo desses animais (MANNA *et al.*, 2008b; MANNA *et al.*, 2009; MATEO *et al.*, 2009). Contudo, a suspensão das terapias resultou em recidiva, com diagnóstico positivo para o parasito através de técnicas moleculares.

Algumas vacinas terapêuticas também são utilizadas em associação com a terapia convencional para tratar os animais. Estas foram capazes de controlar o surgimento de sintomas, impedindo a evolução da doença para formas polissintomáticas e morte. Adicionalmente, essas vacinas reduziram a carga parasitária na pele dos animais, surgindo como alternativas para a interrupção do ciclo de transmissão da LV (GUARGA *et al.*, 2002; BORJA-CABRERA *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2007; BORJA-CABRERA *et*

al., 2010; AGUIAR-SOARES *et al.*, 2014). Contudo, permanecem os casos de recidiva após suspensão dos tratamentos.

Devido à reduzida eficácia dos fármacos testados até o momento em cães, aliados às chances de surgimento de resistência na terapia da LVH (Organização Mundial de Saúde – WHO), tem sido estimulado como alternativa ao tratamento quimioterápico convencional da LVC o desenvolvimento de novos fármacos (MIRÓ *et al.*, 2008; ROATT *et al.*, 2014).

1.5 DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS TERAPIAS

Na busca por um tratamento adequado para a LVC, faz-se necessária a descoberta de drogas que tenham ação direta no parasito e que possam potencializar a resposta imune do hospedeiro, interferindo nos mecanismos de evasão da resposta imune dos protozoários (GOSH *et al.*, 2003; BARBOSA *et al.*, 2015). Os avanços alcançados no entendimento da relação entre o parasito e o hospedeiro vêm permitindo o desenvolvimento de novos fármacos (KUMARI *et al.*, 2008; SIQUEIRA NETO *et al.*, 2010; CANTACESS *et al.*, 2015).

Estudos iniciais identificaram inibidores da tripanotona e tripanotona redutase (COLOTI; ILARI, 2011), enzimas do metabolismo das poliaminas da *Leishmania* envolvidas nos mecanismos de resistência do parasito à miltefosina e anfotericina como fármacos com potencial leishmanicida (BROTHERTON *et al.*, 2014; CARNIELLI *et al.*, 2014). Outros estudos identificaram os beta-aminoalcanóis com N-substituído como potenciais fármacos pois atuam diretamente nas mitocôndrias do parasito levando a um colapso energético (ABENGÓZAR *et al.*, 2015).

Em estágios mais avançados de testes, a marbofloxacina, uma fluorquinolona de terceira geração, age inibindo a ação das enzimas DNA girase e/ou topoisomerasas. A ação direta sobre as formas promastigotas do parasito foi mais eficiente do que as drogas de referência no tratamento da LVC (antimoniato de meglumine e estibogluconato de sódio). Já a ação leishmanicida contra amastigotas dentro de macrófagos de cão foi igual ao antimoniato de meglumine e maior que a do estibogluconato de sódio (VOULDOUKIS *et al.* 2006). Outro fármaco testado com sucesso *in vitro* é a fração MF29 do haloacetamido, um composto capaz de interferir nos microtúbulos das formas

promastigotas de *Leishmania* (HIAM *et al.*, 2006). Mais recente, o 17-AAG, um inibidor específico de HSP90, foi capaz de diminuir a carga parasitária em macrófagos infectados com *Leishmania spp. in vitro*, e controlar a infecção em camundongos infectados *in vivo*, com diminuição significativa da carga parasitária no local da inoculação (PETERSEN *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2014). Além destes, um grupo de fármacos chamado nitroimidazol mostrou ação contra vários protozoários, dentre eles os causadores da LV (WYLLIE *et al.*, 2012), assim como a Paromomicina, que está na fase III de ensaio clínico com ótimos resultados de segurança e efeito na remissão de sinais clínicos, além de poucos efeitos colaterais, se tornando um fármaco promissor para ser utilizado em combinação de terapias (JAMIL *et al.*, 2015).

1.6 DETC COMO ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DA LVC

Uma das maneiras mais eficazes de destruição de parasitos intracelulares como a *Leishmania in vitro* é a ativação das células fagocíticas com as citocinas IFN- γ e TNF (McBRIDE; BORUTAITE; BROWN, 1999; MILLER *et al.*, 2000), induzindo um aumento significativo na produção de reativos intermediários do oxigênio, principalmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido (O_2^\cdot) e peroxinitrito ($ONOO^\cdot$) (Caixa 1). Em 2001, Gantt *et al.*, demonstraram a importância leishmanicida do superóxido (O_2^\cdot) em macrófagos murinos e humanos estimulados com IFN- γ em resposta a *Leishmania chagasi*.

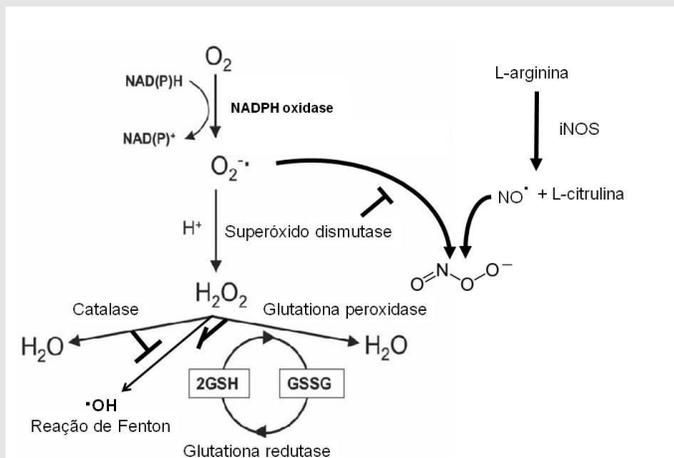
Por outro lado, o excesso de O_2^\cdot é considerado também como um agente citotóxico, com papel central na destruição tecidual do hospedeiro por provocar danos nas camadas lipídicas, nas proteínas, ou no DNA celular, inibindo as suas funções normais e causando doenças (BABIOR, 1997; BABIOR, 2000). As enzimas antioxidantes (catalase, peroxirredoxinas e superóxido dismutase-SOD) são a principal arma contra os danos oxidativos. Contudo, uma superexpressão das enzimas antioxidantes pode estar associada a um mecanismo de escape dos patógenos contra o estresse oxidativo (SPATH *et al.*, 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que a adição de SOD1 exógena em cultura de macrófagos humanos infectados com *Leishmania amazonensis in vitro* aumentava significativamente a carga parasitária com macrófagos altamente vacuolizados semelhantes aos de lesões de leishmaniose difusa (KHOURI *et al.*, 2009).

Recentemente, nós também demonstramos que altos níveis de SOD1 plasmático estavam associados à falha terapêutica na leishmaniose cutânea (KHOURI *et al.*, 2014). Tudo isso fortalece o possível papel do SOD1 como alvo terapêutico para tratar a leishmaniose.

Caixa 1. Mecanismos oxidativos

Os sistemas enzimáticos responsáveis pela produção do superóxido são citocromo P450, o xantina oxidase, o mono-oxigenase e o NADPH oxidase. A NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase) é um complexo enzimático ligado a membrana que catalisa a produção de superóxido (O_2^-) a partir de oxigênio e do NADPH, através da reação: $2O_2 + NADPH \leftrightarrow 2O_2^- + NADPH^+ + H^+$. O complexo enzimático NADPH oxidase se apresenta inativo nos fagócitos em repouso, porém é rapidamente ativado após o estímulo das células por microorganismos, certos polipeptídeos inflamatórios (C5a) e as citocinas IFN- γ e TNF- α . Nas células em repouso, as subunidades de NADPH oxidase estão distribuídas entre o citosol e as membranas de vesículas e organelas intracelulares. Neste ambiente, as porções citosólicas migram para a membrana assim que os fagócitos são estimulados e se associam ao fator ativo. As organelas intracelulares e a membrana plasmática que envolve a célula fundem-se, delimitam os fagócitos e liberam O_2^- no meio extracelular e no interior dos vacúolos fagocíticos.

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima conservada de bactérias, protozoários até mamíferos e é a mais importante enzima antioxidante no combate às espécies reativas de oxigênio – ROS (especificamente O_2^-). Até o momento, foram descritas três isoformas de SOD para os mamíferos. Duas isoformas, SOD1 e SOD3, possuem Cu e Zn no seu centro catalítico. A SOD1 ou CuZnSOD está localizada nos compartimentos citoplasmáticos intracelulares, enquanto que a SOD3 ou ECSOD é excretada. Por fim, a SOD2 possui manganês (Mn) como co-fator e se localiza na mitocôndria das células dos mamíferos (MnSOD ou SOD2). A SOD é capaz de catalisar a dismutação do radical anion de superóxido (O_2^-) formando peróxido de hidrogênio e oxigênio: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$, controlando o aumento indiscriminado de superóxido e a formação de peróxido de nitrito ($OONO^{\cdot}$) (MCBRIDE *et al.*, 1999). O peróxido de hidrogênio formado após a ação das SODs nas moléculas de superóxido deve ser imediatamente removido a fim de evitar a formação de radicais de hidroxila altamente reativos. Esta função de desintoxicação das moléculas de peróxido de hidrogênio é normalmente efetuada pela glutatona ou pela catalase. Estas enzimas são capazes de reduzir o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ($H_2O + O_2$)



O dietioditiocarbamato (quelante de cobre) é um potente inibidor de SOD1 e sua ação contra a *Leishmania* vem sendo testada nos últimos anos. Inicialmente nosso grupo demonstrou que em ensaios com macrófagos (humanos e murinos) infectados, o DETC foi capaz de destruir os parasitos intracelulares *in vitro*. Quando testado *in vivo* (camundongos BALB/c), os animais apresentaram menor tamanho da lesão, assim como

uma carga parasitária reduzida na orelha e no linfonodo de drenagem (KHOURI *et al.*, 2010). Recentemente o DETC foi adsorvido em bio-curativos de celulose para o tratamento *in vivo* de camundongos BALB/c com resultados similares aos obtidos anteriormente (CELLES *et al.*, dados não publicados).

Nosso grupo, então, avaliou os níveis da atividade enzimática de SOD no plasma de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* (sinônimo *L. chagasi*) em área endêmica do estado do Maranhão. Foi demonstrado que as manifestações clínicas mais graves da LVC estavam associadas ao aumento dos níveis plasmáticos desta enzima (dados não publicados). Mais recentemente, Solcá *et al.*, (2016) demonstraram que os níveis de SOD1 estavam elevados em animais com sinais clínicos de LVC, indicando sua participação na patogênese da doença. Desta forma, a utilização do Dietilditiocarbamato (DETC), um inibidor da SOD1, tem mostrado resultados promissores e surge como uma alternativa viável no tratamento da LVC. Sendo assim, a nossa hipótese foi que o DETC pode ser capaz de atuar no tratamento contra o parasito causador da leishmaniose visceral canina.

Nesta tese, nós demonstramos que o DETC possui ação leishmanicida direta contra formas extracelulares (promastigotas) e intracelulares (amastigotas) de *Leishmania infantum*. Ademais, o DETC diminuiu significativamente a carga parasitária e melhorou a função hepática (alanina aminotransferase - ALT) em cães experimentalmente infectados com *Leishmania infantum*. Por fim, o DETC também foi capaz de melhorar significativamente a clínica e aumentar a sobrevida dos cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Entre os anos de 2003 e 2013, a ocorrência de leishmaniose visceral humana (LVH) no Brasil foi superior a 38.000 casos. Mais da metade desses casos foram oriundos da região nordeste. Dentre os estados mais afetados está o Piauí, que responde por mais de 10% dos casos da doença humana e dos óbitos da região (BRASIL, 2015), sendo a maioria desses casos ocorridos na capital Teresina, uma das principais regiões endêmicas do país (DRUMOND; COSTA, 2011; HARHAY, 2011; OLIVEIRA, 2014). O primeiro surto de LVH em Teresina ocorreu na década de 1980, mais precisamente entre os anos de 1981 e 1985, quando o número de casos acumulados foi de 1.059, muito superior aos 24 casos diagnosticados nos cinco anos anteriores (COSTA *et al.*, 1990). De acordo com dados da Secretaria Estadual de Saúde do Piauí, entre os anos de 1999 e 2009, houve a confirmação de 1.369 casos na cidade, representando mais de 50% dos casos de todo o estado Piauí (ARAGÃO; DOURADO; PACHECO, 2008; DRUMOND; COSTA, 2011).

Assim como a LVH, a leishmaniose visceral canina (LVC) é endêmica em várias regiões do Brasil, tendo destaque novamente o estado do Piauí, particularmente a região metropolitana de Teresina. Entre os anos de 1999 e 2009 quase 21.000 casos da doença foram registrados em Teresina (PI) pela secretaria estadual de saúde (ARAGÃO; DOURADO; PACHECO, 2008; DRUMOND; COSTA, 2011). Ao compartilhar o mesmo ambiente com o ser humano o cão exerce a função de principal hospedeiro doméstico da doença. Estudos mostram que a ocorrência da doença canina precede o surgimento de casos humanos. A medida de controle mais executada é a eutanásia de cães sorologicamente positivos, medida que mostra resultados altamente controversos e que enfrenta muita resistência da sociedade.

O tratamento dos cães é uma das alternativas estudadas para tentar impedir a disseminação da doença. Nos vários estudos realizados com esse enfoque, a falta de cura parasitológica e as recidivas clínicas estão entre as principais dificuldades encontradas. O desenvolvimento de novos fármacos é necessário para modificar essa realidade. Nosso grupo tem investido no estudo da SOD1, enzima importante para a sobrevivência do parasito, como principal alvo de uma abordagem terapêutica para a

doença. Para isso, avaliamos a ação do fármaco em modelos caninos *in vitro* e *in vivo*, utilizando animais experimental e naturalmente infectados com *Leishmania infantum* (capítulos I e II) e desenvolvemos um algoritmo matemático baseado em sinais clínicos que identificasse os diferentes estágios de progressão da doença (capítulo III).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Testar o efeito leishmanicida do DETC no tratamento da leishmaniose visceral canina.

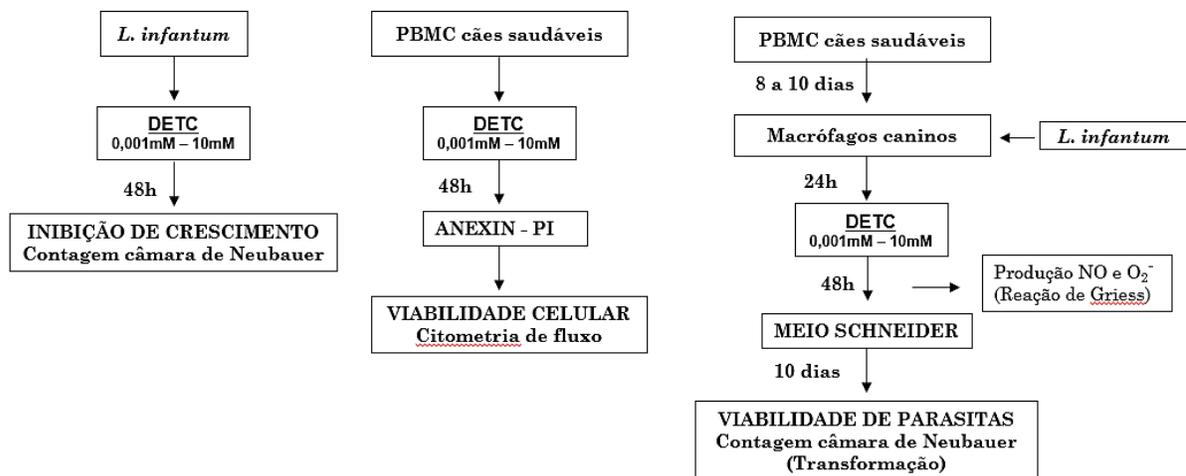
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito leishmanicida do DETC sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum*;
- ✓ Avaliar o efeito citotóxico do DETC sobre células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães saudáveis;
- ✓ Analisar a ação leishmanicida do DETC em macrófagos diferenciados de CMSP caninas infectadas com *Leishmania infantum*;
- ✓ Mensurar a produção de óxido nítrico e superóxido por macrófagos caninos infectados com *Leishmania infantum* e tratados com DETC;
- ✓ Acompanhar as mudanças na apresentação de sinais clínicos sugestivos para LVC antes, durante e após o tratamento de cães experimental e naturalmente infectados com *Leishmania infantum* e tratados com DETC;
- ✓ Avaliar as mudanças na carga parasitária, níveis plasmáticos de atividade de superóxido dismutase (SOD), variáveis hematológicas e bioquímicas em cães experimental e naturalmente infectados com *Leishmania infantum* e tratados com DETC;
- ✓ Desenvolver uma ferramenta de diagnóstico clínico que auxilie na classificação dos diferentes estágios de progressão da doença.

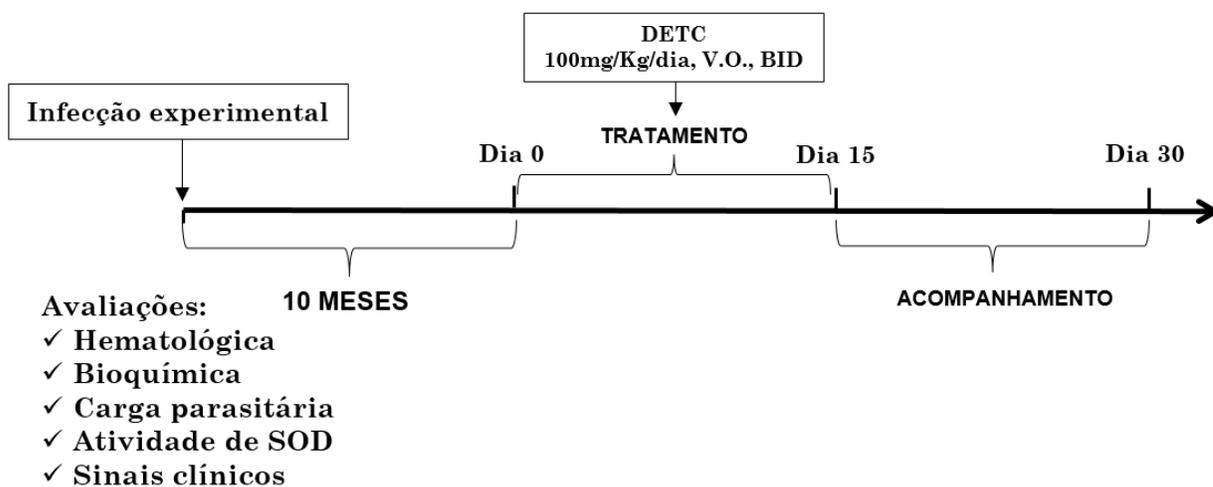
4. DESENHO EXPERIMENTAL

4.1 CAPÍTULO I

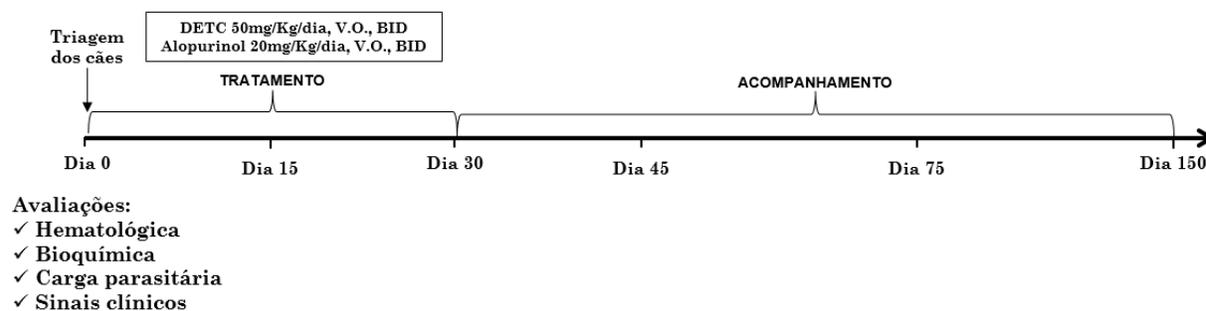
In vitro



In vivo



4.2 CAPÍTULO II



4.3 CAPÍTULO III



Folha de rosto capítulo I

O controle da LVC é um desafio para as autoridades sanitárias e para pesquisadores. Dentre as medidas de controle, a busca por novos fármacos para o tratamento dos cães vem sendo estudada. Para realizar testes de atividade de determinado fármaco contra um parasito são necessárias várias avaliações. Analisando não apenas a segurança, mas parâmetros que representem a eficácia do fármaco contra o parasito.

O capítulo I dessa tese foi desenvolvido como o primeiro trabalho sobre a ação do DETC em cães com LVC. Como o estudo da atividade de fármaco foram realizados em outros modelos, foram realizados testes com células caninas e em animais experimentalmente infectados. Antes de testarmos nos animais, realizamos testes *in vitro* para provar a segurança do fármaco. Foram calculados o CC₅₀, IC₅₀ e índice de seletividade em células mononucleares de sangue periférico e em promastigotas em cultura axênica de *Leishmania infantum*. Em seguida testamos o efeito do DETC sobre a viabilidade de parasitos intracelulares em macrófagos derivados de CMSP de cães saudáveis. Ao mesmo tempo avaliamos a produção de radicais livres em CMSP infectadas ou não, tratadas com DETC ou não.

Em seguida, utilizamos oito cães da raça Beagle experimentalmente infectados com *Leishmania infantum* para testar o tratamento *in vivo*. Foram avaliados o perfil hematológico, bioquímico, clínico, os níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD) e a carga parasitária antes, durante e após o tratamento com DETC para aferir se essas variáveis sofreram influência do tratamento.

5.CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA TERAPIA COM DIETILDITIOCARBAMATO (DETC) EM CÃES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum*.

Resumo

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença endêmica no Brasil, transmitida pela picada de fêmeas do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e possui como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania*. Os tratamentos atualmente empregados na LVC não produzem a cura parasitológica, além de serem constantes as recidivas clínicas. A superóxido dismutase (SOD) tem sido implicada como uma enzima que evita a ativação de macrófagos e impede a morte de parasitos intracelulares. **OBJETIVO:** Avaliar *in vitro* e *in vivo* a ação do DETC, um potente inibidor de SOD, em cães experimentalmente infectados com *Leishmania infantum*. **MÉTODOS:** Nos ensaios *in vitro* de citotoxicidade foram utilizadas células mononucleares periféricas de cães saudáveis e promastigotas metacíclicas de *Leishmania infantum*. Para o ensaio *in vivo*, animais infectados com o parasito foram tratados na posologia de 100mg/kg/dia, dividida em duas administrações por via oral, durante 15 dias. Foram avaliados parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos, níveis de atividade de SOD e carga parasitária dos animais, antes, durante e 15 dias após o término do tratamento. **RESULTADOS:** Nos ensaios *in vitro* viu-se que o DETC foi 4,3x mais tóxico para os parasitos de que para as células, que o fármaco tem ação sobre o crescimento e viabilidade dos parasitas, atuando possivelmente através do controle do metabolismo do superóxido (O_2^-). No ensaio *in vivo* foi vista uma queda na carga parasitária, concomitante a uma diminuição dos níveis plasmáticos de SOD e redução dos níveis de alanina aminotransferase (ALT), todas estatisticamente significantes ($p < 0,05$). **CONCLUSÕES:** O DETC foi capaz de diminuir o número de parasitos *in vitro* e *in vivo*, melhorando alguns parâmetros laboratoriais, podendo ser considerada uma futura alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral canina.

Palavras – chave: Leishmaniose visceral, Cão, DETC, Dietilditiocarbamato, Tratamento.

Abstract

INTRODUCTION: Canine visceral leishmaniasis (CVL) is an endemic disease in Brazil and has vector females of *Lutzomyia longipalpis* sand flies and etiological agent, the protozoan *Leishmania*. Animals present a lot of clinical signs, directly related with immune response. Currently treatments used in CVL doesn't lead to parasitological cure and clinical relapses are a constant factor. Dismutase superoxide (SOD) was implied as a component that interferes with macrophages activation and with intracellular parasites death. **AIM:** Evaluated action of DETC therapy, a potent SOD inhibitor, in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* (Sinônimo *L. chagasi*). **METHODS:** In the *in vitro* cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs were used and metacyclic promastigotes of *Leishmania infantum*. For the *in vivo* test animals infected with the parasite were treated in the dose of 100mg/Kg/day divided in two administrations orally for 15 days. We evaluated clinical, haematological, biochemical, SOD activity levels and parasite load of animals before, during and 15 days after the end of treatment. **RESULTS:** In *in vitro* tests it was observed that DETC was 4.3 more toxic to the parasites than to cells, the drug has an action on the growth and viability of parasite, possibly acting through the control of metabolism superoxide (O_2^-). In the *in vivo* test is seen a decrease in parasite load, concomitant with a decrease in plasma levels of SOD and reduction in alanine aminotransferase (ALT) levels, all statistically significant ($p < 0,05$). **CONCLUSIONS:** The DETC was able to decrease the number of parasites *in vitro* and *in vivo*, improving some laboratory parameters and may be considered to be a future alternative for the treatment of canine visceral leishmaniasis.

Keywords: Visceral leishmaniasis, Dog, DETC, Diethyldithiocarbamate, Treatment.

5.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença crônica que afeta principalmente o homem e o cão (COSTA *et al.*, 2000), sendo caracterizada por um amplo espectro de sintomatologia clínica. O cão é considerado o reservatório doméstico da doença, desenvolvendo um importante papel em seu ciclo, principalmente pelo intenso parasitismo cutâneo, a proximidade a ambientes frequentados por humanos, e ser refratário aos tratamentos existentes (MORENO; ALVAR, 2002; TRAVI *et al.*, 2002; ALVAR *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2011). Assim, é substancialmente importante tratar de maneira eficaz os cães infectados para bloquear o ciclo de infecção da *Leishmania spp.*

O tratamento mais utilizado para a leishmaniose visceral canina (LVC) é o antimoniato pentavalente, geralmente em associação com o alopurinol, que promove uma remissão temporária dos sinais clínicos, com recidivas frequentes (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; MANNA *et al.*, 2008). Além do antimoniato e alopurinol, a anfotericina B e a miltefosina apresentam resultados similares, com redução da carga parasitária, melhora clínica dos cães, mas com quadros de recidiva constantes (WALKER *et al.*, 1998; PAILA, SAHA, CHATTOPADHYA, 2010; MANNA *et al.*, 2009). Para superar a ausência de terapias mais eficazes e definitivas para tratar LVC muitos estudos têm sido desenvolvidos para a descoberta de novos fármacos (BARBOSA, *et al.*, 2015).

Uma das vias interessantes para busca por novas terapias para a LVC é através da compreensão dos mecanismos de ação das células contra os parasitos. Nesse contexto, Khouri *et al.*, (2010) testaram *in vitro* e *in vivo* a ação de um potente inibidor da superóxido dismutase 1 (SOD1), o Dietilditiocarbamato (DETC). A SOD1 é uma enzima citoplasmática que participa da conversão de superóxido para água (H₂O) e oxigênio (O₂), controlando o aumento da quantidade de superóxido e a formação de peróxido de nitrito (OONO⁻) dentro da célula (MCBRIDE, BORUTAITE, BROWN, 1999; MILLER *et al.*, 2000). Portanto, a inibição de SOD1 contribui para um aumento na produção do superóxido, destruindo a *Leishmania spp.* intracelular (GANTT *et al.*, 2001). O tratamento com DETC foi capaz de reduzir a carga parasitária e o tamanho da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* e reduzir a taxa de infecção por

Leishmania amazonenses e *L. braziliensis* em macrófagos humanos e murinos *in vitro*.

Diante dos resultados do DETC contra a *Leishmania* no modelo murinho e humano e resultados do nosso grupo que mostram níveis aumentados de SOD plasmática no soro de cães polissintomáticos (dados não publicados e SOLCÁ *et al.*, 2016), o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do uso de DETC, *in vitro* e *in vivo*, na LVC experimental. Nós observamos que o DETC foi capaz de reduzir a carga parasitária no linfonodo dos cães tratados, além de diminuir os níveis plasmáticos de ALT e aumentar o número de linfócitos, que podem significar melhor funcionamento do fígado e ativação da resposta imune.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Animais utilizados no ensaio pré-clínico

Os dez animais que foram utilizados nesse ensaio foram adquiridos em uma região não endêmica para LVC no Brasil (Canil Tad's Henriques, Colombo, estado do Paraná). Antes de serem submetidos ao tratamento esses animais foram utilizados em um ensaio para teste de uma vacina para LVC. Neste ensaio alguns cães foram imunizados com a vacina-teste e em seguida desafiados com uma infecção experimental através da inoculação de 10^7 leishmanias/animal. Os cães cedidos para esse estudo faziam parte do grupo controle e receberam apenas o plasmídeo vazio, sem exposição a antígenos vacinais antes da infecção. Para mimetizar a infecção natural, os parasitos foram suspensos em meio Schneider e adicionado de sonicado de dois pares de glândula salivar de flebotomíneo (*Lutzomyia longipalpis*), aproveitando-se as características imunogênicas da saliva (LIP – FIOCRUZ /BA). Além disso, a via de inoculação escolhida foi a intradérmica e o local foi a face interna do pavilhão auricular, um dos locais preferidos pelo vetor da doença (COSTA *et al.*, 2013).

Depois do desafio, os animais foram acompanhados semanalmente por veterinários, e avaliados quanto ao surgimento de sinais clínicos sugestivos da LVC e a positividade em testes diagnósticos para o parasito. Oito meses após a infecção, a maioria dos animais apresentava sinais clínicos da doença, principalmente alopecia, úlceras na pele, despigmentação de focinho e aumento de linfonodos, assim como positividade em exames parasitológicos. A partir desse momento, como já estava previsto no projeto inicial, esses cães com LVC experimental foram então submetidos a um tratamento piloto com DETC.

Sendo assim, para a realização do ensaio *in vivo* foram utilizados 10 animais da raça Beagle, seis machos e quatro fêmeas, com 18 meses de idade, pesando em torno de 11 Kg. Esses animais foram mantidos em canil experimental (telado e com entrada controlada) no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (CCA/UFPI), sob cuidados de médicos veterinários, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*. A criação, a experimentação e o bem-estar dos animais utilizados neste experimento estavam de acordo com os Princípios internacionais para Pesquisas

Biomédicas envolvendo Animais, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética de Cuidados com Animais do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/FIOCRUZ – BA com sob o número de protocolo 020/2011.

5.2.2 Tratamento dos animais com DETC

Foi utilizado como fármaco-teste o dietiltiocarbamato (DETC) (CuZn superoxide dismutase/SOD1 inhibitor, SIGMA – ALDRICH). A escolha da posologia foi baseada nos estudos realizados pelo Integrated Risk Information System (IRIS, 2009). Como visto, cães da raça Beagle só apresentaram sinais de toxicidade quando submetidos à dose de 300mg/Kg (SUNDERMAN, *et al.*, 1967; IRIS, 2009). Além disso, Khouri *et al* (2010) utilizaram 50mg/Kg/dia de DETC no tratamento de camundongos infectados com *Leishmania braziliensis*. Sendo assim, foi estipulada uma dose de 100mg/kg/dia para o nosso estudo, sendo administrada por via oral durante 15 dias.

5.2.3 Avaliação clínica, hematológica e bioquímica dos animais tratados com DETC

O escore clínico dos animais foi avaliado de forma criteriosa e de acordo com ficha de avaliação clínica baseada nos dados de Manna *et al.* (2008), com modificações (Apêndice 1). As avaliações foram realizadas antes (dia 0), durante (dia 15) e após o tratamento (dia 30). Nos três tempos avaliados durante o experimento, sangue periférico foi coletado da veia jugular ou cefálica em tubos com heparina e sem anticoagulante. Parte do sangue não coagulado foi utilizado para a realização de hemograma completo, o restante foi centrifugado a 290G para separação do plasma que foi estocado a -20°C para posterior dosagem dos níveis de atividade de SOD. O soro isolado do tubo sem anticoagulante foi utilizado para verificar os níveis plasmáticos de alanina-aminotransferase (ALT) e creatinina.

5.2.4 Quantificação dos níveis de atividade de SOD nos animais tratados com DETC

A avaliação dos níveis de atividade de SOD foi verificada através do kit “Superoxide Dismutase Assay Kit (Caymanchem, USA)”, seguindo-se as orientações do fabricante. Brevemente, as amostras de plasma canino foram diluídas 1:5 com tampão de amostra e a leitura da atividade enzimática da SOD foi realizada por espectrofotometria, utilizando comprimento de onda entre 440 e 460 nm.

5.2.5 Quantificação da carga parasitária nos animais tratados com DETC

Foi coletado aspirado de linfonodo (diluído em Tris-EDTA) para a averiguação da carga parasitária nos diferentes períodos de tratamento (0, 15 e 30 dias). A extração de DNA dessas amostras foi realizada utilizando-se o protocolo fenol-clorofórmio já publicado anteriormente (COSTA *et al.*, 2013).

A quantificação do DNA de *Leishmania infantum* foi realizada por PCR em tempo real. Os primers iniciadores utilizados foram: sense – 5' - GGTTAGCCGATGGTGGTCTT-3' e anti-sense – 5' - GCTATATCATATGTCCAAGCACTTACCT-3' e sonda TaqMan (5' - ACCACCTAAGGTCAACCC - 3' (Acesso Genbank: AF169140) de minicírculos de kDNA (CASTILHO, SHAW, FLOETER-WINTER, 2003). A quantificação dos parasitos foi realizada utilizando uma curva padrão com variação de 10^6 até 1 parasito (DE PAIVA CAVALCANTI *et al.*, 2009). Cada amostra foi avaliada em duplicata, em paralelo à curva padrão. As corridas foram realizadas em um equipamento ABI 7500, utilizando o software SDS 2.0 (Applied Biosystems) e a termociclagem padrão do sistema ABI 7500, com uma desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 44 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, onde é feita a captação da fluorescência.

5.2.6 Isolamento de CMSP de cães saudáveis

Foram utilizadas células mononucleares provenientes de sangue periférico (CMSP) de cães saudáveis, com resultados sorológico e parasitológico negativos para infecção por *Leishmania spp.*, mantidos em canil livre de insetos vetores (Canil de experimentação do CPqGM/FIOCRUZ, Salvador, Bahia) ou pertencentes a proprietários particulares. Foi coletado um volume de 30-90mL de sangue de cada animal em tubos

com EDTA. O CMSP foi separado através de gradiente de centrifugação utilizando Ficoll-Paque (GE Healthcare, Suécia) de acordo com as recomendações do fabricante.

5.2.7 Cultivo dos parasitos para os experimentos *in vitro*

A cepa utilizada foi de *Leishmania infantum* (MCAN/BR/89/Ba-262), cultivada em meio Schneider's, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Hyclone) e 1% de antibiótico (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina – Pen Strep - GIBCO) em estufa BOD a 26°C, em fase estacionária de crescimento.

5.2.8 Inibição do crescimento (IC) de *Leishmania infantum in vitro*

Para avaliar se o DETC possuía ação direta sobre o crescimento da *Leishmania infantum*, 1×10^6 parasitos na fase logarítmica de crescimento foram colocados em placas de 96 poços com meio de cultivo contendo o fármaco em diversas concentrações (0,001 – 0,003 – 0,01 – 0,03 – 0,1 – 0,3 – 1 – 3 – 10mM). As placas foram incubadas em estufa BOD a 26°C e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer após 24 horas de incubação.

5.2.9 Teste de citotoxicidade (CC) do DETC em CMSP de cães saudáveis

Na avaliação da toxicidade do DETC foram utilizados tubos estéreis de polipropileno para cultivo celular (5×10^6 células/ml) em estufa a 5% de CO₂, a 37°C e 95% de umidade. As células foram incubadas com diferentes concentrações de DETC (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10mM) por 48 horas. Após esse período de incubação as células foram marcadas com iodeto de propídio (PI – Invitrogen) por 10 minutos e quantificada a morte celular por incorporação de PI através da citometria de fluxo (BD - FACS Fortessa).

5.2.10 Quantificação da viabilidade dos parasitos intracelulares de CMSP infectados com *Leishmania infantum*

Após a separação do CMSP, as células foram contadas e a concentração ajustada para 1×10^6 células em $500 \mu\text{L}$. Essas células foram distribuídas e incubadas em placas de 24 poços durante 24 horas com meio de cultivo DMEM completo. Em seguida, os poços foram lavados com solução salina estéril para a retirada das células não aderidas e durante oito a dez dias as células foram incubadas para que ocorresse a diferenciação em macrófagos. Durante esse período as células foram observadas diariamente, com substituição do meio e lavagem dos poços para retirada das células mortas ou não aderidas. Em seguida, as células aderidas foram infectadas com *Leishmania infantum* em fase estacionária na proporção de 10 parasitos para cada célula durante 24 horas. Logo depois, os poços foram lavados três vezes com solução salina estéril para a retirada dos parasitos não internalizados e o meio de cultivo foi colocado nos poços. Esperou-se um período de 24 horas para a transformação das formas promastigotas em amastigotas e o meio foi substituído por apenas DMEM completo (controle), ou adicionado de DETC (0,1mM) ou Anfotericina B $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Fungizone; Bristol-Myers Squibb, Bedford, OH), sendo a placa incubada novamente durante 48 horas. Após esse tempo, o meio com as drogas foi retirado, os poços foram lavados novamente com solução salina estéril e substituído por Schneider. As placas foram então incubadas em estufa BOD a 26°C durante dez dias. Após esse período, o conteúdo presente nos poços foi homogeneizado e retirado um volume de $20 \mu\text{L}$ de meio para contagem das formas promastigotas em câmara de Neubauer. Foram realizados dois ensaios com três repetições para cada tratamento (triplicata).

5.2.11 Quantificação da produção de óxido nítrico e superóxido de CMSP tratado com DETC

A quantificação dos níveis de produção de óxido nítrico (NO) e superóxido (O_2^-) *in vitro* foi realizada a partir da Reação de Griess (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Para isso foram utilizadas placas de 96 poços contendo 1×10^3 células por poço. As células foram distribuídas nos poços e incubadas por 24 horas em estufa de CO_2 . Após esse período, as células foram infectadas e tratadas como mencionado no item anterior. Depois do tratamento, o sobrenadante dos poços foi retirado e centrifugado a 490G por

10 minutos. Os procedimentos seguintes foram realizados de acordo com Miranda *et al.* (2001), utilizando uma curva padrão com 11 pontos para a comparação da produção de óxido nítrico e superóxido. Os ensaios foram realizados duas vezes e as amostras foram testadas em quadruplicata.

5.2.12 Análise estatística

Os dados referentes aos resultados da carga parasitária, os níveis de atividade de SOD no linfonodo e os níveis plasmáticos de ALT foram analisados por teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Os dados foram representados pela média \pm SEM e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor que 0.05.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Ação leishmanicida do DETC *in vitro*

Com o intuito de determinar a toxicidade do DETC tanto para a *Leishmania infantum* quanto para as células de CMSP canino foram conduzidos ensaios independentes *in vitro* utilizando diversas concentrações do fármaco. A concentração da droga que inibiu em 50% o crescimento dos protozoários em cultura (IC₅₀) foi de 0,37mM (Figura 1A). Por outro lado, a concentração do fármaco capaz de levar à morte 50% das células submetidas ao tratamento (CC₅₀), foi de 1,61mM (Figura 1B). Dessa maneira, foi possível calcular o índice de seletividade (IS) do DETC no modelo canino ($IS = CC_{50} \text{ CMSP} / IC_{50} \text{ promastigotas}$) que foi de 4,35. Assim, foi demonstrado que o DETC é 4,35 vezes mais tóxico para o parasito do que para as CMSP de cão.

Em seguida, foi avaliada a ação do DETC sobre a sobrevivência do parasito intracelular (amastigotas) após o tratamento de CMSP infectadas com *Leishmania infantum in vitro*. Observou-se que a viabilidade dos parasitos reduziu significativamente nas células tratadas com DETC (0,1mM), resultado similar ao controle positivo (Anfotericina B) utilizado na literatura (Figura 2A).

Para comprovar que a atividade do DETC está associada a alta produção de superóxido (KHOURI *et al.*, 2010), foi avaliado se existia diferença entre a quantidade de radicais livres (NO e O₂⁻) produzida em CMSP caninas tratadas com DETC. Foi demonstrado que o DETC não alterou os níveis de óxido nítrico (NO) produzido (Figura 02. B). Por outro lado, células infectadas e estimuladas com DETC apresentaram uma produção de O₂⁻ significativamente maior do que as células controles (P=0,0193) (Figura 2C).

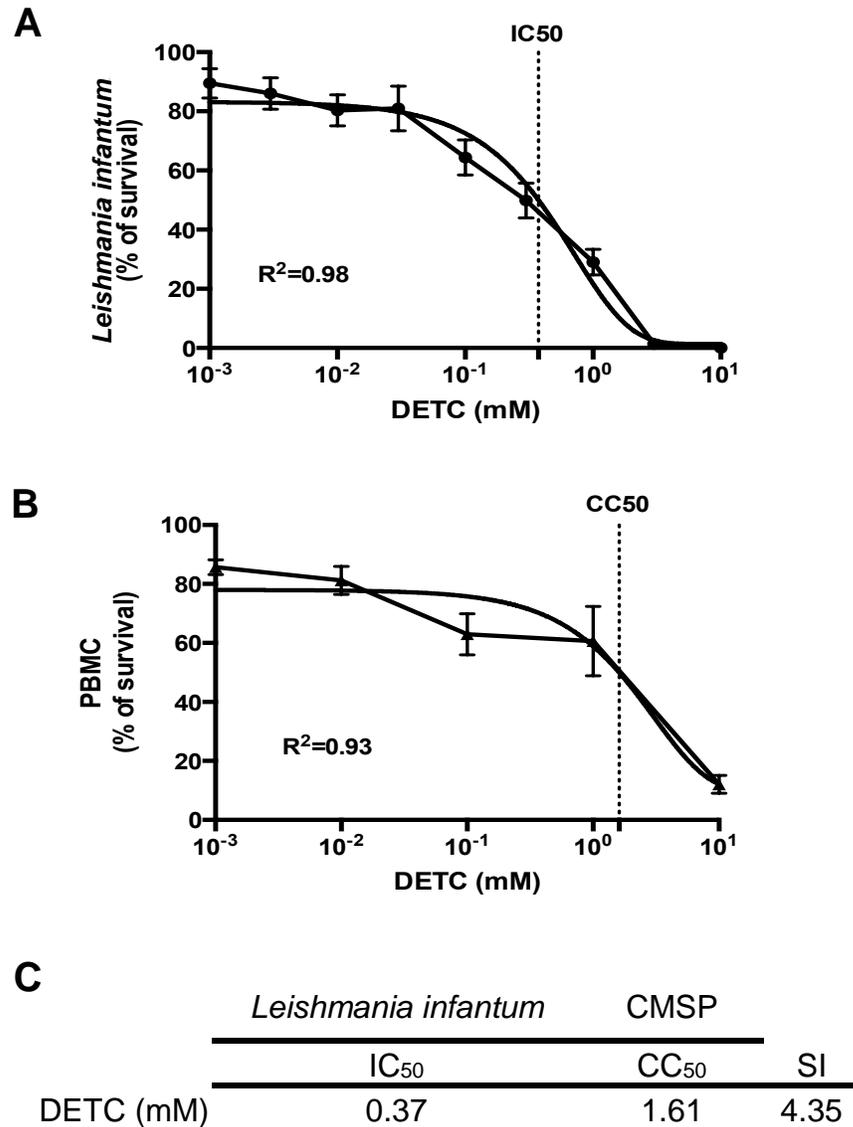


Figura 1. Estudo da toxicidade de diferentes concentrações do DETC sobre *Leishmania infantum* e células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães saudáveis. **A** – Curva de sobrevivência de promastigotas de *Leishmania infantum*. **B** – Curva de sobrevivência de CMSP saudáveis. **C** – Valores da concentração capaz de inibir em 50% o número de protozoários em cultura (IC₅₀), da concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) e índice de seletividade para (SI) = CC₅₀ CMSP / IC₅₀ promastigotas.

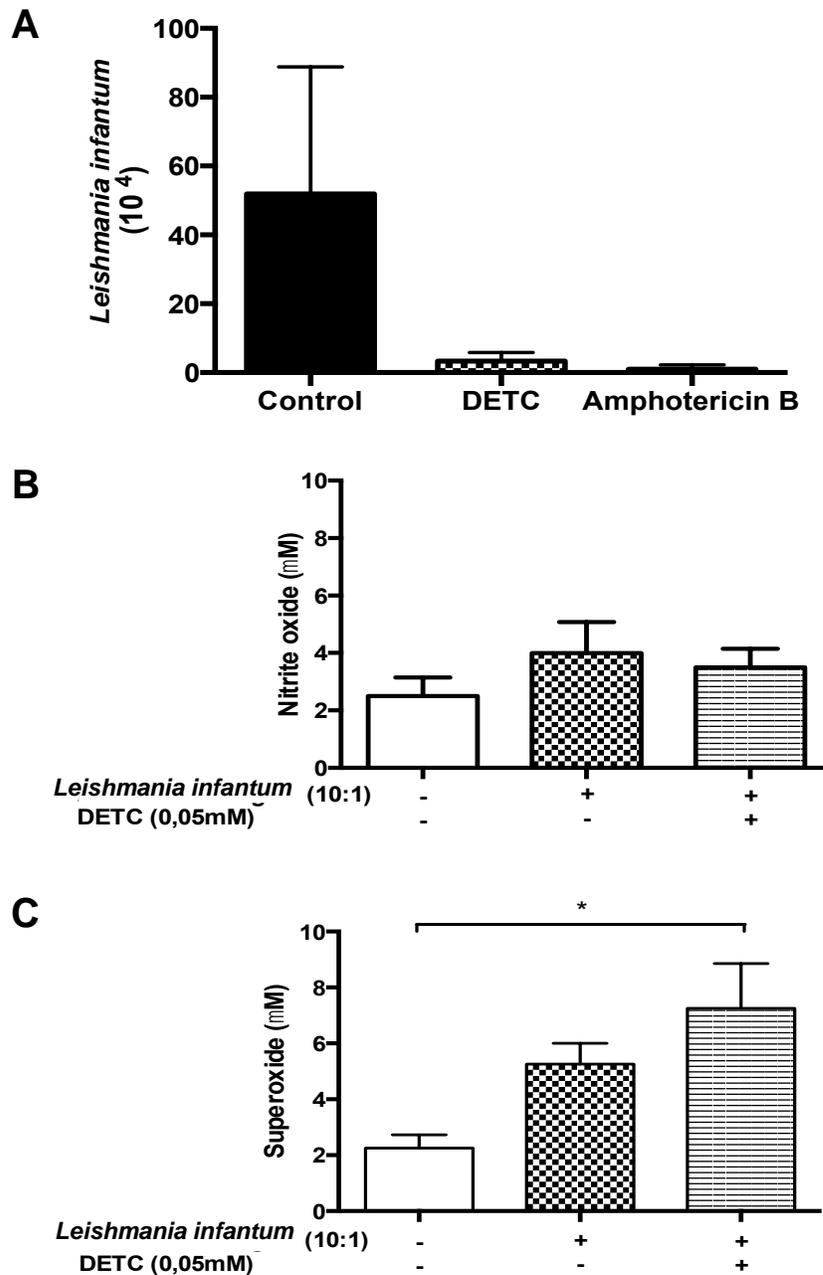


Figura 2. Atividade do DETC sobre *Leishmania infantum* e produção de óxido nítrico (NO) e superóxido (O_2^-) por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães saudáveis. **A** – Contagem de formas promastigotas que sofreram transformação após serem incubadas durante 48h com meio (control), com DETC (0,1mM) ou com Anfotericina B (25 μ g/mL); **B** e **C** – produção de NO e O_2^- (C) por CMSP de cão infectadas (+) ou não (-), tratadas (+) ou não (-) com DETC (0,05mM) durante 24h (Kruskal-Wallis *P=0,0193).

5.3.2 Avaliação clínica, hematológica, bioquímica, da carga parasitária e atividade de SOD dos cães infectados experimentalmente com *L. Infantum* e tratados com DETC

Para avaliarmos a ação leishmanicida do DETC *in vivo*, 10 cães da raça Beagle, controles negativos de um ensaio de eficácia de vacina, não vacinados, (COSTA *et al.*, 2013), infectados experimentalmente com inóculo intradérmico de 10^7 leishmanias e um par de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* por 10 meses, foram incluídos neste estudo. O grupo avaliado era constituído por 50% de fêmeas com mediana do peso de 10,9Kg e mediana de idade de 18 meses. O DETC foi administrado em cápsulas de gelatina (500 mg), utilizando-se a via oral para administração, duas vezes ao dia. Os animais foram tratados com o DETC por 15 dias consecutivos e avaliados para parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos, carga parasitaria e atividade da SOD (enzima alvo do DETC). Os cães apresentavam uma mediana da carga parasitária de 76,5 parasitos por 200ng de DNA extraído de punção do linfonodo poplíteo e uma mediana da atividade de SOD no plasma de 0,08 U/mL.

Os resultados das avaliações clínicas estão resumidos na tabela 2. Não houve diferença estatisticamente significativa no escore clínico dos animais nos tempos avaliados e a maioria dos sinais clínicos sofreu pouca variação. Destacaram-se o aumento de linfonodo presente em todos os animais durante todo o experimento (principalmente o poplíteo) e aumento da presença de lesões na mucosa durante o tratamento, com declínio 15 dias após.

A carga parasitária sofreu uma redução significativa ($p=0,0009$) depois do início do tratamento, comportamento idêntico ao visto nos níveis de atividade da enzima superóxido dismutase, que apesar de não ter sido significativo ocorreu de maneira gradual com o decorrer do ensaio (Figura 3A).

No hemograma viu-se que o número de todos os tipos de leucócitos avaliados estava dentro da faixa de normalidade para a espécie canina, com um aumento no número de linfócitos ($p=0,0011$) e redução do número de neutrófilos imaturos ($p=0,016$) com o tratamento (Tabela 2 e figura 4A e 4B). Nos índices hematimétricos apenas a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) aumentou de maneira

significativa no final do experimento ($p=0,0001$) (Figura 4 C). Entretanto, o número de hemácias se manteve abaixo dos níveis normais antes, durante e após o tratamento ($4,76\pm 1,153$; $4,62\pm 0,8824$; $4,80\pm 0,5852 \times 10^6/\mu\text{L}$ respectivamente), caracterizando um quadro de anemia. Já na avaliação bioquímica apenas os níveis de alanina aminotransferase (ALT) tiveram diferença estatisticamente significante, sofrendo uma queda durante e após o tratamento ($p=0,0013$) (Figura 4D).

Tabela 1. Sinais clínicos de cães experimentalmente infectados com *Leishmania infantum* antes, durante e depois do tratamento com 100mg/Kg/dia DETC.

		Dia 0 (n=10)	Dia 15 (n=9)	Dia 30 (n=9)
Pelagem				
	Boa	60% (6)	56% (5)	56% (5)
	Regular	0% (0)	0% (0)	11% (1)
	Ruim	40% (4)	44% (4)	33% (3)
Estado nutricional				
	Normal	90% (9)	78% (7)	100% (9)
	Magro	10% (1)	22% (2)	0% (0)
	Caquético	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Variação de peso				
	Nenhuma	90% (9)	89% (8)	100% (9)
	Até 10%	10% (1)	11% (1)	0% (0)
	Maior que 10%	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Unhas				
	Normal	60% (6)	33% (3)	44% (4)
	Aumentadas	40% (4)	33% (3)	33% (3)
	Grandes	0% (0)	33% (3)	22% (2)
Linfonodos				
	Normais	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	1 par	20% (2)	0% (0)	0% (0)
	2 ou mais pares	80% (8)	100% (9)	100% (9)
Lesões de mucosas				
	Ausentes	90% (9)	44% (4)	78% (7)
	Apenas 1	10% (1)	22% (2)	11% (1)
	2 ou mais	0% (0)	33% (3)	11% (1)
Coloração das mucosas				
	Rósea	60% (6)	67% (6)	33% (3)
	Rósea clara	30% (3)	22% (2)	67% (6)
	Pálidas	10% (1)	11% (1)	0% (0)
Secreção ocular				
	Ausentes	80% (8)	78% (7)	56% (5)
	Serosa/mucosa	0% (0)	0% (0)	33% (3)
	Mucopurulenta	20% (2)	22% (2)	11% (1)

Tabela 2. Valores médios das variáveis hematológicas e bioquímicas de cães infectados experimentalmente com *Leishmania infantum* antes, durante e após o tratamento com DETC.

Variables	Reference Value	Day0 (Mean±STD)	Day15 (Mean±STD)	Day30 (Mean±STD)	One-way ANOVA Linear trend
Leucocytes (Cel/ μ L) x 10 ³	6 – 17	7,07±1,747 n=10	7,52±2,377 n=5	8,588±1,936 n=8	
Basophils	0	0±0 n=10	0±0 n=5	0±0 n=8	
Myelocytes	0	0±0 n=10	0±0 n=5	0±0 n=8	
Metamyelocytes	0	0±0 n=10	0±0 n=5	0±0 n=8	
Eosinophils	0,1–125	0,198±0,206 n=10	0,206±0,08 n=5	0,253±0,18 n=8	
Immature Neutrophils	0	0,129±0,239 n=10	0,0124±0,02773 n=5	0±0 n=8	*p=0,016
Lymphocytes	1 – 4,8	1,009,6±0,551 n=10	1,406±0,5507 n=5	2,134±0,57 n=8	**p=0,0011
Neutrophils	3 – 11	5,462±1,56 n=10	5,452±2,164 n=5	6,91±3,8 n=8	
Monocyte	0,15 – 1,35	0,288±0,239 n=10	0,4512±0,2919 n=5	0,351±0,059 n=8	
Erythrocytes	5,5 – 8,5	4,765±1,153 n=10	4,618±0,8824 n=5	4,795±0,5852 n=8	
Hemoglobin (g/dL)	12 – 18	9,58±2,354 n=10	9,72±1,156 n=5	10,5±1,541 n=8	
Hematocrit (%)	37 – 55	27,12±6,661 n=10	27,3±4,929 n=5	27,28±3,956 n=8	
MCV (fl)	60 – 77	57±3,464 n=10	59,2±1,304 n=5	56,63±2,504 n=8	
MCHC (%)	32 – 36	35,19±0,4999 n=10	34±1,194 n=5	38,46±0,5476 n=8	***p=0,0001
Platelets x 10 ³ / μ L	200 – 500	179,7±84,85 n=10	266,6±81,13 n=5	217,1±81,63 n=8	
Creatinine (mg/dL)	0,5 – 1,5	0,98±0,5245 n=10	0,92±0,5119 n=5	0,98±0,7244 n=8	
ALT (U/L)		29,7±19,84 n=10	23±12,14 n=5	8,663±4,555 n=8	**p=0,0013

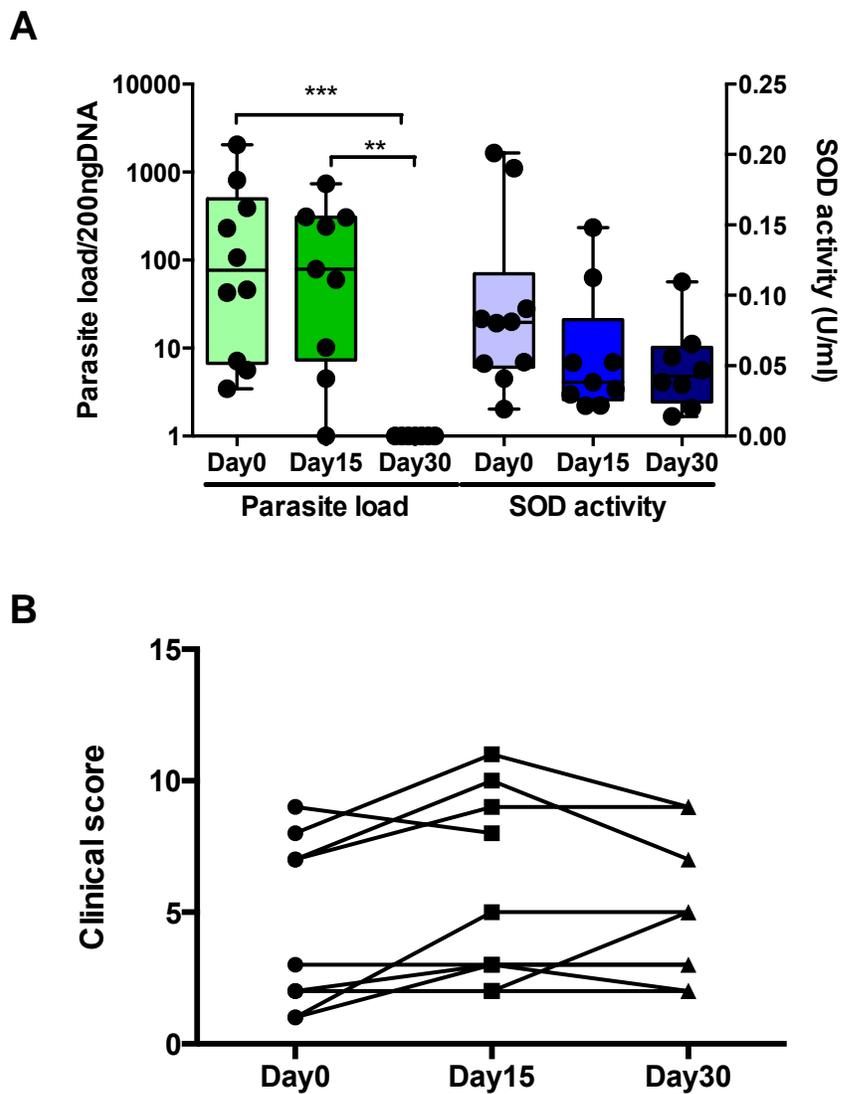


Figura 3. Carga parasitária em aspirado de linfonodo associada a níveis plasmáticos de atividade de SOD em cães antes, durante e após o tratamento com DETC (A) e escore clínico dos animais nestes três tempos do estudo (B). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de sete animais (** $p=0,0009$). (One way ANOVA with post-test Linear trend).

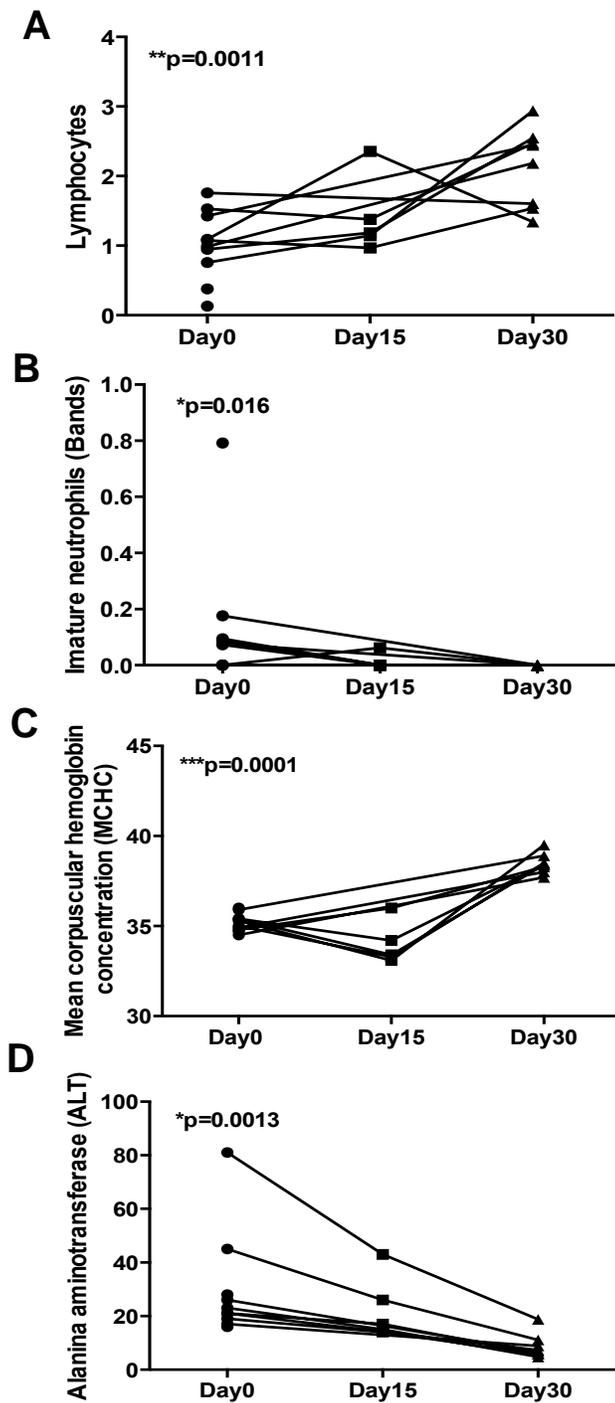


Figura 4. Variáveis hematológicas e bioquímicas de cães com LVC antes, durante e após o tratamento com DETC (One way ANOVA with post-test Linear trend). Lymphocytes Cel/ μ L x 10³.

5.4 DISCUSSÃO

O tratamento de cães com leishmaniose visceral canina é um dos grandes desafios para veterinários e pesquisadores (BANETH; SHAW, 2002; BANETH; AROCH, 2008; DRUMOND; SILVA, 2011). Os fármacos usados até o momento não conseguem ter uma eficácia adequada e os animais doentes acabam sendo eutanasiados ou se tornando reservatórios do parasita, mantendo a doença nas áreas endêmicas (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2003; VERÇOSA *et al.*, 2008). A procura por fármacos que tenham ação não só direta sobre os parasitos, mas também que influenciem nos mecanismos da resposta imune do hospedeiro pode ser uma saída para o tratamento da enfermidade (GOSH *et al.*, 2003; SAVOIA, 2015). Nesse contexto, o estudo realizado testou um novo fármaco para o tratamento da LVC em cães experimentalmente infectados.

Um dos critérios fundamentais para testar a ação de fármacos contra protozoários é a ausência de efeitos tóxicos nas células do hospedeiro. Em nosso estudo observamos que a concentração em que ocorreram efeitos nocivos para a célula (CC_{50}) foi bem maior que a responsável pela inibição do crescimento do parasito (IC_{50}) (Índice de seletividade 4,35), atributo importante para o sucesso no uso do fármaco no combate ao parasito. Essa tendência de toxicidade predominante do DETC no parasito está de acordo com achados em outros modelos experimentais (KHOURI *et al.*, 2010).

Além disso, para a utilização do DETC como droga contra a *Leishmania* é preciso que sua ação contra o parasito seja testada. Em nossos experimentos de transformação de formas promastigotas ficou claro que o fármaco foi capaz de reduzir bastante a viabilidade da *Leishmania*. Resultado que também corrobora com achados da literatura que citam a ação do DETC contra o gênero *Leishmania* (KHOURI *et al.*, 2010) e contra outros parasitos intracelulares (WALKER *et al.*, 1987; MESHNICK *et al.*, 1990; HUBNER *et al.*, 1991). Nesses estudos o mecanismo de atuação do fármaco presumido foi a ativação celular com o aumento de radicais livres do oxigênio.

Dentre os compostos resultantes do metabolismo do oxigênio, o óxido nítrico (NO) e o superóxido ocupam lugar de destaque na ação contra parasitos intracelulares. Em

nosso estudo, a produção de NO não teve diferença entre as células sem infecção, infectadas e infectadas e tratadas com DETC.

Contudo, o mecanismo pelo qual o DETC leva o parasito à morte envolve diretamente o metabolismo do ânion superóxido (O_2^-). Como o fármaco é um inibidor seletivo da enzima superóxido dismutase (SOD) que inativa o superóxido, isso implica na ativação das células infectadas com um aumento da produção de O_2^- , permitindo que essas células adquiram a capacidade de destruir o parasito (KHOURI *et al.*, 2010). Panaro *et al.* (1998) também relataram uma correlação positiva entre a produção de superóxido e a capacidade de células caninas de destruir *Leishmania*. Em nosso estudo, vimos que as células infectadas com *Leishmania* e tratadas com DETC obtiveram uma produção de superóxido maior que as células infectadas, e bem superior às células não infectadas ($p=0,0193$), o que pode indicar o aumento da capacidade de destruição do parasito intracelular em células após o tratamento com esse fármaco.

A destruição do parasito também foi vista no ensaio com os animais onde houve uma diminuição da carga parasitária no linfonodo de cães experimentalmente infectados com *Leishmania infantum* e tratados com DETC. A diminuição da carga parasitária ocorreu não somente no final do tratamento (dia 15) mas durante os 15 dias posteriores de acompanhamento ($p=0,0009$). Aliado a isso, houve uma queda nos níveis plasmáticos de atividade de SOD nos mesmos períodos experimentais, sugerindo um mecanismo de ação similar ao visto nos ensaios com CMSP de cão. Nossos achados corroboram com KHOURI *et al.* (2010), que estudaram o efeito *in vivo* do DETC no tratamento de camundongos BALB/c, experimentalmente infectados com *Leishmania braziliensis*, e demonstraram que o DETC também reduziu a carga parasitária na orelha e linfonodo de drenagem regional dos camundongos, além do tamanho da lesão nesse modelo experimental.

Resultados semelhantes com redução da carga parasitária já foram relatados em outros estudos (KOUTINAS *et al.*, 2001; IKEDA-GARCIA *et al.*, 2007; MANNA *et al.*, 2008), tanto em trabalhos onde foi utilizado apenas um princípio ativo como naqueles que usaram associação de fármacos. Entretanto, em ambos os casos, o resultado tem sido o mesmo, a persistência do agente após o período de tratamento. Em nosso estudo, esse fato também foi observado, porém, mesmo com a redução drástica da carga parasitária

no final do tratamento os animais apresentaram resultados positivos em testes parasitológicos e sorológicos após o final do acompanhamento desses animais.

Apesar da diminuição da carga parasitária, o valor do escore clínico dos animais ou não sofreu alteração ou aumentou durante e após o tratamento. Esses dados discordam aos encontrados por Manna *et al.*, (2009) que encontraram uma correlação positiva entre a diminuição da carga parasitária no linfonodo e a remissão dos sinais clínicos em cães com LVC. Alguns fatores podem ter sido responsáveis por esses achados como o fato dos cães terem sido infectados experimentalmente com alta carga parasitária, o que pode ter aumentado a gravidade da evolução clínica da doença. O tempo transcorrido entre a infecção e o tratamento ter sido longo, levando a um estágio avançado da doença experimental onde a remissão clínica poder ser difícil e demorada, já que a ação do DETC envolve modulação da resposta imune das células.

Apesar disso, a diminuição da carga parasitária no linfonodo é um resultado promissor pois uma vez que com a carga parasitária diminuída o animal pode tornar-se menos infectante para o inseto vetor. Além do mais, se houver uma adequação no protocolo de tratamento, ou seja, a associação do DETC com alguma droga leishmanicida, conforme proposto por WALKER *et al.* (1987), tanto a remissão dos sinais clínicos como uma redução da carga parasitária mais duradoura podem ocorrer.

Os resultados também evidenciaram mudanças significativas em poucos parâmetros do leucograma e hemograma. O aumento visto no número de linfócitos ($p=0,0011$) é um bom indicativo pois essa célula participa diretamente da resposta do organismo contra agentes patológicos e um acréscimo em sua quantidade pode ter como consequência uma maior eficiência da ação leishmanicida das células do sistema imune. Em contrapartida, estranhamente, ocorreu uma redução do número de neutrófilos imaturos (bastão). Como essa célula também participa diretamente da resposta a parasitos, o esperado em quadros infecciosos como a LVC é que a quantidade destas células estivesse aumentada.

Além disso, a maioria das variáveis testadas se manteve dentro dos parâmetros normais para a espécie canina (JAIN, 1993). Esses dados diferem dos encontrados por outros pesquisadores que detectaram alteração no número de outros tipos celulares

(como os eosinófilos e monócitos) em animais com LVC (CIARAMELLA *et al.*, 1997; SLAPPENDEL; TESKE, 1997; FIGUEREDO *et al.*, 2012).

Os índices hematimétricos foram pouco alterados com o tratamento, apesar de a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) ter aumentado de maneira significativa no final do experimento, uma alteração que isolada não possui muito significado biológico. Já a quantidade de hemácias sofreu um aumento durante e após o tratamento com DETC, porém, ainda se manteve abaixo dos níveis normais, caracterizando um quadro anêmico característico de cães com LVC (COSTA-VAL *et al.*, 2007; WOERLY *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2012).

Outros parâmetros avaliados foram os níveis creatinina e de alanina aminotransferase (ALT). A creatinina não sofreu variações significantes durante o estudo, se mantendo dentro dos níveis normais da espécie antes, durante e após o tratamento ($0,98 \pm 0,5245$; $0,92 \pm 0,5119$; $0,98 \pm 0,7244$ mg/dL, respectivamente). Majid e Kopkan (2007) identificaram uma relação causal entre dano renal e elevação de superóxido devido a administração de DETC. Como os níveis de creatinina são tidos como marcadores indiretos da função renal (POLZIN *et al.*, 1997; TODOLÍ *et al.*, 2010) nossos resultados indicam que essa função não foi prejudicada pelo uso do fármaco. Essa diferença pode ter ocorrido, provavelmente, porque a via de administração utilizada em nosso experimento foi a oral, diferente da utilizada por Majid e Kopkan (2007) que usaram a via endovenosa, o que pode ter interferido nas propriedades farmacocinéticas e no efeito do DETC.

A variação na dosagem plasmática de ALT é uma informação pouco expressiva para o diagnóstico da LVC, porém é um importante parâmetro para avaliar a evolução da doença e acompanhar o tratamento (CASTRO *et al.*, 2012). Nossos resultados demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis de ALT plasmático, o que pode indicar uma melhora na função hepática, já que o aumento desta enzima está relacionado com lesão hepática (KOUTINAS *et al.*, 2001; IKEDA-GARCIA *et al.*, 2007), o que sugere que o tratamento com DETC não exerceu efeito tóxico sobre as células hepáticas.

Dentre as limitações do estudo, a falta de um grupo controle pode ter mascarado a ação do fármaco em proteger os animais da evolução dos sinais clínicos para a LVC,

pois o controle usado foi o mesmo animal antes e depois do tratamento, reduzindo bastante as inferências sobre a evolução clínica destes. Outras limitações podem ser o tempo de tratamento e de acompanhamento dos cães, pois alguns autores conseguiram observar efeitos dos fármacos testados em tempos maiores de tratamento, repetições de ciclos e acompanhamentos dos animais por longos períodos. Por isso a realização de mais testes com ajustes destes pontos pode confirmar de maneira mais eficiente ação do DETC no combate à LVC.

Diante do exposto, podemos concluir que o DETC foi capaz de auxiliar tanto na redução do crescimento dos parasitos em meio de cultivo como na diminuição da carga parasitária no linfonodo de cães com LVC. Além disso, provocou uma melhora em alguns parâmetros fisiológicos que são utilizados como marcadores biológicos da evolução de doenças parasitárias ou da eficiência de tratamento. Apesar de não ter levado à remissão dos sinais clínicos e nem destruído completamente o parasito, acreditamos que o DETC possa ser uma opção para o tratamento da LVC pela sua baixa toxicidade para a espécie, eficiência contra o parasito, possuir via de administração rápida, fácil e prática (via oral), além de ser um fármaco pouco dispendioso para os proprietários.

5.5 REFERÊNCIAS

ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 81-88, 2004.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. **Vet. J.**, v. 175, n. 1, p.14-5, 2008.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 315-324, 2002.

CASTILHO, T. M.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **J. Clin Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 540-6, 2003.

CASTRO, I. P. *et al.* Hepatic and proteic profile in dogs with visceral leishmaniasis. **Biosci. J.**, v. 28, p. 799-804, 2012.

CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 141, p. 539-543, 1997.

COSTA C. H. *et al.* Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 997-1000, 2000.

COSTA, D. J. *et al.* Experimental Infection of Dogs with *Leishmania* and Saliva as a Model to Study Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, n. 8, v. 4, 2013.

COSTA-VAL, A. P. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. **Vet. J.**, v. 174, p. 636-643, 2007.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 1, p. 111-26, 2006.

- DE PAIVA CAVALCANTI, M. *et al.* The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **Vet. J.**, v. 182, p. 356–358, 2009.
- DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. L. Forty years of visceral leishmaniasis in the state of Piauí: a review. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 53, n. 1, p. 3-11, 2011.
- FIGUEREDO, L. A. *et al.* Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*-infected dogs from Pernambuco, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, p. 418-420, 2012.
- FREITAS, J. C. C. *et al.* Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, p. 24-29, 2012.
- GANTT, K. R. *et al.* Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J. Immunol.**, v. 167, n. 2, p. 893-901, 2001.
- GOSH, S.; GOSWAMI, S.; ADHYA, S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. **Biochem. J.**, v. 369, p. 447-52, 2003.
- HÜBNER, L. *et al.* Enhancement of monocyte antimycobacterial activity by diethyldithiocarbamate (DTC). **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 13, n. 8, p. 1067-72, 1991.
- IKEDA-GARCIA, F. A. *et al.* Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Vet. Parasitol.**, v. 143, n. 3-4, p. 254-9, 2007.
- JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger. 417p. 1993.
- KHOURI, R. *et al.* DETC Induces *Leishmania* Parasite Killing in Human *In vitro* and Murine *In vitro* Models: A Promising Therapeutic Alternative in Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. 1-9, 2010.
- KOUTINAS, A. F. *et al.* A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 98, n. 4, p. 247-61, 2001.

MAJID, D. S.; KOPKAN, L. Nitric oxide and superoxide interactions in the kidney and their implication in the development of salt-sensitive hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.**, v. 34, p. 946–952, 2007.

MANNA, L. *et al.* Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet. J.**, v. 177, n. 2, p. 279-82, 2008.

MANNA, L. *et al.* Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. **Vet. J.**, v. 182, n. 3, p. 441-5, 2009.

MCBRIDE, A. G.; BORUTAITE, V.; BROWN, G. C. Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and subsequent cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1454, n. 3, p. 275-88, 1999.

MESHNICK, S. R. *et al.* Antimalarial activity of diethyldithiocarbamate: Potentiation by copper. **Biochem. Pharmacol.**, v.40, n. 2, p. 213-6, 1990.

MILLER, M. A. *et al.* Inducible Resistance to Oxidant Stress in the Protozoan *Leishmania chagasi*. **J. B. C.**, v. 275, p. 33883-9, 2000.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.**, v.18, n. 9, p.399-405, 2002.

OLIVEIRA, S. S.; ARAÚJO, T.M. Evaluation of control measures for visceral leishmaniasis (kala azar) in an endemic area in Bahia, Brazil (1995-2000). **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 6, p. 1681-1690, 2003.

PAILA, Y. D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, A. Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 399, p. 3, p. 429-33, 2010.

PANARO, M. A. *et al.* Evaluation of killing, superoxide anion and nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog monocytes. **Cytobios.**, v. 95, n. 380, p.151-60, 1998.

POLZIN, D. J. Insuficiência Renal Crônica [Chronic Kidney Disease]. In: Ettinger, S. J., Feldman, E. C., (1 Ed), **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, São Paulo, São Paulo, pp. 2394- 2431, 1997.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.

SLAPPENDEL, R. J.; TESKE, E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime®) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. **Vet. Quart.**, v. 19, p. 10-13, 1997.

SOARES, M. R. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Trop.**, v. 117, n. 1, p.6-9, 2011.

SOLCÁ, M. S. *et al.* Circulating Biomarkers of Immune Activation, Oxidative Stress and Inflammation Characterize Severe Canine Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-7, 2016.

SUNDERMAN, F. W.; PAYNTER, O. E.;GEORGE, R. B. The effects of the protracted administration of the chelating agent, sodium diethyldithiocarbamate (dithiocarb). **Am. J. Med. Sci.** v. 254, n. 1, p. 24-34, 1967.

TODOLÍ, F. *et al.* A. Dynamics and predictive potential of antibodies against insect-derived recombinant *Leishmania infantum* proteins during chemotherapy of naturally infected dogs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 795-800, 2010.

TRAVI, B. L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Research in Veterinary Science**, v. 72, n. 1, p. 83–86, 2002.

VERÇOSA, B. L. A. *et al.* Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 1-7, 2008.

WALKER, E. M. *et al.* Effects of diethyldithiocarbamate and structural analogs in mice with systemic candidal infections. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 56, n. 2, p. 253-63, 1987.

WALKER, S. *et al.* Amphotericin B in lipid emulsion: stability, compatibility, and *in vitro* antifungal activity. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 42, n. 4, p. 762-6, 1998.

WOERLY, V. *et al.* Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitol. Res.**, v. 105, p. 463-469, 2009.

Apêndice 1 – Ficha adaptada de Manna *et al.*, (2008) para avaliação clínica dos cães.

FIOCRUZ - UFPI					
Projeto:					
Avaliação clínica:					
Data: _____ Dia da avaliação: _____					
Investigador: _____					
Microchip: _____ Sexo: _____					
Peso: _____ Kg Estado geral: ativo ____ apático ____ Ectoparasitos: pulgas ____ carrapatos ____ Outros _____					
Parâmetros clínicos	Pontuação	Classificação:			Observações:
Estado nutricional		Normal- obeso (0)	Magro (1)	Caquético (2)	
Variação de peso		Maior ou igual (0)	Até 10% (1)	Maior que 10% (2)	
Pelagem		Bom- ótimo (0)	Regular (1)	Ruim (2)	
Unhas		Normais (0)	Aumentadas (1)	Grandes (2)	
Coloração de mucosas		Róseas (0)	Rósea clara (1)	Pálidas (2)	
Lesão em mucosas		Ausente (0)	Apenas 1 lesão (1)	2 ou mais lesões (2)	
Baço		Não palpável (0)	-	Palpável (2)	
Linfonodos		Normais (0)	Aumentados, apenas 1 par (1)	Aumentados 2 ou mais pares (2)	
Linfonodos (localização)	-	Sub-mandibulares	Pré -escapulares	Poplíteos	
Secreção ocular		Ausente (0)	Serosa, mucosa (1)	Mucopurulenta (2)	
TOTAL DE PONTOS					
Hemograma:			Bioquímica:		
Hemoglobina g/dl:			ALT:		
Hematócrito: %			Creatinina:		
Leucócitos Totais:					
Plaquetas:			Sorologia leish: Positivo		Negativo:
Proteínas totais:					

Folha de rosto capítulo II

No capítulo I foram realizados testes com DETC sobre sua atividade leishmanicida e sua ação em animais experimentalmente infectados. Nesse estudo foi observado que o DETC foi capaz de diminuir a carga parasitária e melhorar os níveis de ALT. No entanto, a falta de mudanças no estado clínico e nos outros parâmetros laboratoriais pode ter sido pelo curto tempo de tratamento ou de acompanhamento.

Para o segundo estudo foram utilizados animais naturalmente infectados. Por se tratarem de animais em condições naturais, várias das influências sofridas pelos cães podem ter resultados sobre o desenvolvimento da doença. Esses animais foram provenientes de condições sanitárias, de exposição, carga de infecção, situações que podem influenciar diretamente no curso da doença e, possivelmente, na resposta ao tratamento.

Para o segundo estudo, foi utilizado um ciclo de tratamento maior, de 30 dias. Tempos de tratamento maiores podem permitir um tempo de ação do fármaco maior, podendo tornar o tratamento mais eficiente. O período de acompanhamento de cinco meses também foi superior ao utilizado no estudo I. Como o efeito de alguns fármacos podem ser observados apenas bastante tempo depois do tratamento, é de extrema importância o acompanhamento dos animais por grandes períodos. Além disso, os animais utilizados no estudo foram provenientes da cidade de Teresina, área altamente endêmica para a LVC.

6. CAPÍTULO II

TRATAMENTO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum* COM DIETILDITHIOCARBAMATO (DETC)

Resumo

INTRODUÇÃO: No Brasil, principalmente nos estados da região nordeste, a Leishmaniose visceral canina (LVC) ocorre de maneira endêmica. Nesse local, a espécie causadora da enfermidade é a *Leishmania infantum* que é transmitida por fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Uma das medidas de controle da LVC poderia ser a terapia de cães doentes, porém, até o momento, nenhum dos tratamentos empregados consegue alcançar a cura parasitológica, além de provocarem vários efeitos colaterais assim como quadros de toxicidade marcante. **OBJETIVO:** O objetivo do estudo foi testar a atividade contra leishmania do dietilditiocarbamato (DETC) em animais com LVC. **MÉTODOS:** Para isso, dezesseis cães naturalmente infectados foram divididos em dois grupos: oito animais foram tratados com DETC 50mg/kg, via oral, duas vezes ao dia, e os oito restantes foram tratados com Alopurinol 20mg/Kg, via oral, duas vezes ao dia. Em ambos os grupos, a duração do tratamento foi de 30 dias. Antes, durante e após o tratamento foram avaliados parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e a carga parasitária dos animais. **RESULTADOS:** Dos parâmetros hematológicos avaliados apenas a quantidade de hemácias, o percentual do hematócrito, e a concentração de hemoglobina foram maiores significativamente no grupo tratado com Alopurinol, apesar dos valores apresentados pelos dois grupos estarem dentro dos níveis padrões para a espécie. Nos parâmetros bioquímicos somente os níveis de alanina aminotransferase (ALT) se mantiveram acima dos níveis normais para a espécie nos dois grupos durante todo o estudo. A carga parasitária não sofreu variações significativas nos dois grupos. O DETC foi capaz de diminuir o escore clínico dos cães e aumentar a sobrevida dos cães em comparação ao tratamento com o Alopurinol. **CONCLUSÕES:** Apesar da necessidade de mais estudos o DETC surge como uma possível alternativa para o tratamento da LVC.

Palavras – chave: Infecção natural, LVC, Cão, Dietilditiocarbamato, Tratamento.

Abstract

INTRODUCTION: In Brazil, mainly in the states of the northeast, the canine visceral leishmaniasis (CVL) is endemic. There, the cause of the disease species is *Leishmania infantum* is transmitted by female *Lutzomyia longipalpis*. One of the LVC control measures could be therapy dogs, but, none of the treatments employed can achieve parasitological cure, and several cause side effects as well as pictures of remarkable toxicity. **AIM:** The aim of the study was to test the activity against leishmania of diethyldithiocarbamate (DETC) in animals with LVC. **METHODS:** For this, sixteen naturally infected dogs were divided into two groups, eight animals were treated with DETC 50mg/Kg orally, two times daily, and the remaining eight were treated with Allopurinol 20mg/Kg orally twice daily. In both groups, the duration of treatment was 30 days. Before, during and after treatment were evaluated clinical, hematological, biochemical and parasite load of animals. **RESULTS:** Hematological parameters evaluated only the amount of red blood cells, the percentage of hematocrit and hemoglobin concentration were significantly higher in the group treated with allopurinol, although the values presented by the two groups are within the levels standards for the species. In the biochemical parameters only alanine aminotransferase (ALT) levels remained normal levels for the species in both groups throughout the study. The parasite load did not change significant variations in both groups. **CONCLUSIONS:** The DETC was able to reduce the clinical score of dogs and increase survival of dogs compared to treatment with allopurinol. Despite the need for further study the DETC emerges as a possible alternative for the treatment of CVL.

Keywords: Visceral leishmaniasis, Dog, DETC, Diethyldithiocarbamate, Treatment.

6.1 INTRODUÇÃO

O complexo de doenças denominado leishmaniose atinge mais de 12 milhões de pessoas no mundo e possui duas formas de apresentação clínica principais, a visceral e a tegumentar (LAINSON; SHAW, 1998; ALVAR *et al.*, 2012; BRASIL, 2014). No território brasileiro a leishmaniose visceral (LV) ou calazar é causada por parasitos da espécie *Leishmania infantum*, transmitida por insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, que acomete principalmente o homem e o cão (SHAW, 1988; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

A região nordeste se destaca pelo grande número de casos da doença, principalmente o estado do Piauí, onde sua capital Teresina é considerada uma das maiores áreas endêmicas para a LV humana e canina (DRUMOND; COSTA, 2011; SOARES *et al.*, 2011). Uma das medidas de controle da doença é a eutanásia de cães sorologicamente positivos. Essa medida é conflitante e quando aliada à legislação brasileira, que proíbe o tratamento de cães com drogas utilizadas no tratamento humano (SILVA *et al.*, 2007; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; BRASIL, 2009), faz com que a busca por novas alternativas para o tratamento tenha crescido bastante (BANETH; SHAW, 2002; NOLI; AUXILIA, 2005; BANETH *et al.*, 2008).

Sendo assim, o tratamento dos cães doentes pode ser uma alternativa que leve à descontinuidade do ciclo de transmissão da doença e, aliado às medidas de controle empregadas pelo Ministério da Saúde, pode cessar a expansão da enfermidade (COSTA *et al.*, 2000; COSTA, 2001; CROFT, SUNDAR; FAIRLAMB., 2006). Alguns fármacos possuem ação conhecida contra a leishmaniose visceral canina (LVC), porém estes ainda não foram capazes de conter a doença, sendo frequentemente observadas recidivas clínicas, resultados positivos em testes diagnósticos que buscam o parasita, seu DNA ou resposta imune específica contra o agente, após o tratamento (WALKER *et al.*, 1998; ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2007). Em adição, os fármacos usados apresentam vários efeitos colaterais ou possuem vias de administração pouco práticas, dolorosas e/ou dispendiosa (SCHETTINI *et al.*, 2003; DE MOURA *et al.*, 2005; MANNA *et al.*, 2009b).

Os medicamentos ditos de referência para o tratamento da LVC são o Alopurinol e o Antimoniato de meglumine. Apesar de melhora clínica conseguida principalmente com o uso do Alopurinol por longos períodos, as recidivas aliadas à persistência dos parasitos limitam os resultados desses fármacos (KOUTINAS *et al.*, 2001; GUARGA *et al.*, 2002; IKEDA-GARCIA *et al.*, 2007; MANNA *et al.*, 2008). Ainda, o surgimento de cepas resistentes a esses tratamentos faz aumentar ainda mais a necessidade de novos fármacos ou mudanças que levem a uma maior eficiência dos existentes (CARRIÓ; PORTUS, 2002; CROFT *et al.*, 2006). Nesse contexto, formulações diferenciadas de drogas conhecidas como a Anfotericina B, o próprio antimoniato, e aminoglicosídeos têm sido empregadas na luta contra a infecção causada pelo parasito (BERMAN *et al.*, 1998; VEXENAT *et al.*, 1998; SCHETTINI *et al.*, 2003; DAS *et al.*, 2009). Recentemente, alguns fármacos têm se destacado bastante, como é o caso do 17-(allylamino) -17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), um análogo da geldanamincina (inibidor específico da HSP90) que mostrou resultados promissores, assim como haloacetamido contra *Leishmania* (HIAM *et al.*, 2006; PETERSEN *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, o nosso grupo identificou e caracterizou o Dietilditiocarbamato (DETC), um eficaz inibidor da Superóxido Dismutase (SOD), enzima importante na defesa do parasito às respostas do hospedeiro, como um potente fármaco contra a infecção por *Leishmania spp* (KHOURI, *et al.*, 2009; KHOURI, *et al.*, 2010; KHOURI, *et al.*, 2014; SOLCÀ *et al.*, 2016). No estudo mais recente, o nosso grupo realizou um ensaio clínico com cães da raça Beagle experimentalmente infectados com *Leishmania* que demonstrou uma diminuição significativa da carga parasitária no linfonodo e redução dos níveis de ALT durante e depois do tratamento (SILVA *et al.*, 2016, submitted).

Devido ao caráter multifatorial e complexo da LVC (MORENO; ALVAR, 2002; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; CARVALHO *et al.*, 2015), a maioria dos estudos para avaliar a ação de fármacos na LVC utiliza animais naturalmente infectados nos ensaios (IKEDA-GARCIA *et al.*, 2007; IKEDA-GARCIA *et al.*, 2008; MARQUES *et al.*, 2008; GÓMEZ-OCHOA *et al.*, 2009; OLIVA *et al.*, 2010; TRAVI, 2014). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação do DETC em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, através de parâmetros hematológicos e bioquímicos, da carga parasitária no linfonodo e dos sinais clínicos desses animais. Devido à baixa carga

parasitária desde o início do estudo, não foi possível observar diferenças importante entre os tratamentos com DETC e Alopurinol neste parâmetro. Contudo o tratamento com DETC foi capaz de diminuir o escore clínico e aumentou a sobrevida dos cães em relação ao tratamento com Alopurinol.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Animais selecionados para o estudo

Foram utilizados 16 cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*, provenientes da cidade de Teresina, região endêmica para a leishmaniose visceral canina (LVC). Os animais foram doados pela Gerência de Controle de Zoonoses (GEZOON – FMS/PMT) ou por proprietários clientes do Laboratório de Sanidade Animal (LASAN-UFPI) mediante assinatura de um termo de doação.

Para serem incluídos no ensaio os animais deveriam ter resultado positivo em pelo menos um dos testes parasitológicos e um dos sorológicos para LVC. Os testes parasitológicos foram baseados na observação direta do parasito, seja em esfregaço ou em cultivo realizados com aspirado de linfonodo (poplíteo) e de medula óssea (crista do esterno). Nos animais que apresentavam lesões de pele sugestivas da doença (como úlceras, dermatite esfoliativa ou crostas cutâneas), foram feitos também raspados de pele. Esse material foi fixado com metanol, corado com panótico rápido (LB-Larboclin, Brasil) e avaliado em microscópio óptico. O cultivo do aspirado foi feito em tubos contendo meio de cultura NNN (Novy-MacNeal-Nicolli) enriquecido com 1mL de Schneider's Insect[®], mantidos em estufa tipo BOD (Biologic oxygen Demand), a 23°C durante um mês com avaliação a cada 3 dias. Os exames sorológicos foram o TR DPP[®] Leishmaniose visceral canina (Bio-Manguinhos) e ELISA, exames estes que são realizados rotineiramente no LASAN (UFPI).

Além da positividade ou não nos testes diagnósticos, os animais foram selecionados levando em conta critérios de inclusão e exclusão. Dentre os critérios de inclusão, o animal deveria ser capaz de suportar o confinamento durante o período de tratamento e possuir via de administração sem anormalidades que impedissem a administração dos medicamentos. Os critérios de exclusão utilizados foram animais que possuíam outras enfermidades, submetidos a algum protocolo de tratamento para LVC, em estágio muito avançado da doença (caquexia, insuficiência renal crônica ou quadros semelhantes), fêmeas prenhes ou em lactação, animais muito jovens (menos de 4

meses) ou com idade muito avançada (animais senis) e cães positivos para *Ehrlichia canis*.

Dos 16 cães selecionados, oito eram machos e oito fêmeas, com idade acima de quatro meses, sem raça definida e pesando entre 4 e 24Kg. Um mês antes do início dos experimentos, todos os cães foram imunizados com vacina antirrábica (Raiva-vet – Biovet) e submetidos à vermifugação (Drontal plus – Bayer; 164mg/Kg) para retirar essas fontes de instabilidade e aumentar a proteção de todos os que participaram da pesquisa. Esses animais ficaram em canil telado específico para experimentos com animais que possuem potencial para transmissão de LVC. Os cães foram acompanhados por médicos veterinários e receberam água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. Aliado a isso, todos os cuidados sugeridos pelos Princípios Internacionais para Pesquisas Biomédicas para garantir o bem-estar dos animais durante os experimentos foram seguidos à risca, além de ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UFPI) sob o número 003/13.

6.2.2 Tratamento dos animais

Inicialmente, os cães foram pareados por escore clínico e carga parasitária do aspirado de linfonodo e divididos uniformemente em dois grupos com oito animais cada. Um grupo foi tratado com 50mg/Kg/dia de dietilditiocarbamato (DETC, Sigma – Aldrich) por via oral e o outro grupo com 20mg/Kg/dia de alopurinol (manipulado) via oral. Ambos os tratamentos tiveram duração de trinta dias. Os fármacos foram distribuídos em cápsulas de gelatina para não interferir na ação do mesmo no intestino do cão.

6.2.3 Acompanhamento dos animais

Os animais foram submetidos a testes de hemograma e bioquímico em seis períodos experimentais: antes do tratamento (dia 0), durante o tratamento (dias 15 e 30) e após o tratamento (dias 45, 75 e 150). O hemograma foi realizado em contador de células veterinário BC-2800 Vet Mindray, com contagem diferencial dos leucócitos. Dosagens bioquímicas séricas foram realizadas para constatar os níveis de proteínas totais, fosfatase alcalina, transaminase alanina aminotransferase ALT (TGP), albumina, creatina e ureia, com kit Bioclin seguindo-se as recomendações dos fabricantes (JAIN,

1993; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997). Além disso, foi feita uma avaliação clínica criteriosa de sinais sugestivos para LVC baseada em ficha de avaliação adaptada de Manna *et al.* (2009a) (SILVA *et al.*, 2016, submitted) que atribui valores de escore para presença de sinais clínicos. Esta avaliação clínica foi realizada nos mesmos tempos experimentais citados acima. Também foi realizada uma avaliação da sobrevivência dos cães no segundo ano (dia 720), sendo quantificado como óbitos os animais que foram eutanasiados devido à gravidade dos sinais clínicos, como os que morreram por causas naturais.

6.2.4 Carga parasitária

Foi extraído o DNA do aspirado de linfonodo utilizando Fenol – clorofórmio (Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1, Sigma), baseado em trabalho de Costa *et al.*, (2013). A concentração e pureza do DNA foram verificadas através de espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo) pela absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280nm, respectivamente.

A quantificação dos parasitos foi realizada utilizando uma curva padrão com variação de 10^6 até 1 parasito (CAVALCANTI *et al.*, 2009). Cada amostra foi avaliada em duplicata, em paralelo à curva padrão. As reações foram realizadas em um equipamento ABI 7500, utilizando o software SDS 2.0 (Applied Biosystems) e a termociclagem padrão do sistema ABI 7500, com uma desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, onde foi feita a captação da fluorescência. Os primers iniciadores utilizados foram baseados nos minicírculos de kDNA de *Leishmania infantum* (GenBank accession number AF169140) de acordo com Rolão *et al.* (2003), constituídos de: sense – 5'-GGCGTTCTGCAAATCGGAAAA-3', e anti-sense – 5'-CCGATTTTTGGCATTTTTGGTCGAT-3' e sonda TaqMan_FAM-5'-TTTTGAACGGGATTTCTG-3' (Acesso GenBank: AF169140). 9µL de amostra de DNA (200ng) foram adicionados a 16 µL de uma mistura constituída de 12,5 µL de 2x TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems), 1,25 µL de cada primers e 1,0 µL de sonda TaqMan MGB (FAMTM dye-labeled, Applied Biosystems), para um volume final de 25 µL de reação.

6.2.5 Análise estatística

As variáveis foram submetidas ao teste Kolmogorov-Smirnov e, de acordo com sua normalidade, classificadas em paramétricas (Teste t de Student, on-way ANOVA com teste múltiplo de Bonferroni ou linear trend e área sob a curva com Test t de Student) e não-paramétricas (teste Mann Whitney e Kruskal-Wallis), todos bicaudados, foram realizados usando o software GraphPad 6.0. Os dados estão representados pela mediana e inter-quartis (Interquartile ranges – IQR), e as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0.05$.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Características clínicas, parasitária, bioquímica e hematológica antes do tratamento dos cães incluídos no estudo

Para este ensaio clínico, dezesseis cães foram criteriosamente selecionados e alocados em dois grupos distintos. A fim de reduzir diferenças sistemáticas causadas por possíveis vieses de seleção, os animais foram pareados e alocados entre os grupos de tratamento considerando os valores da carga parasitária e o escore clínico (Tabela 1 e Figura 1A e 1B). Foram analisados 23 parâmetros hematológicos e bioquímicos (Tabela 1). Destes 23 parâmetros avaliados, apenas o número absoluto de linfócitos (DETC $m=2456$, IQR=1854-4040; Alopurinol $m=1562$, IQR=758,5-2022; $p=0,015$), os níveis de fosfatase alcalina (DETC $m=41,5$, IQR=34,25-46,00; Alopurinol $m=68,5$, IQR=56,25-73,75; $p=0,01$) e os níveis de ureia (DETC $m=28,5$, IQR=22,00-35,25; Alopurinol $m=40,5$, IQR=30,25-62,25; $p=0,028$) foram significativamente diferentes entre os grupos antes do início do tratamento (Tabela 1 e Figura 1C-E). Adicionalmente, apenas três parâmetros encontravam-se acima dos limites normais para a espécie quando analisado a mediana dos grupos, incluindo os níveis de ALT (DETC $m=24$, IQR=18,25-35; Alopurinol $m=29$, IQR=18,75-32,5), de albumina (DETC $m=4,35$, IQR=3,67-4,9; Alopurinol $m=4,15$, IQR=3,3-5,05) e proteínas totais (DETC $m=10,1$, IQR=8,35-10,65; Alopurinol $m=9$, IQR=8,2-9,27). Somente a quantidade de plaquetas estava abaixo dos limites normais (DETC $m=114,5$, IQR=62,75-181; Alopurinol $m=193$, IQR=146,8-206,8) e (Tabela 1 e Figura suplementar 1). Assim, estes resultados demonstram que os grupos são estatisticamente similares entre si, garantindo a qualidade das análises estatísticas comparativas durante e após tratamento.

6.3.2 Avaliação hematológica e bioquímica dos animais durante e após o tratamento

Após a alocação dos animais e definição dos grupos, os cães foram tratados com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia), durante 30 dias. Nós avaliamos os efeitos da intervenção durante o tratamento e nos meses subsequentes (Tabela 1, Figura Suplementar 1 e 2), em intervalos de tempo pré-determinados (15, 30, 45, 75 e 150 dias).

Os animais tratados com Alopurinol apresentaram a quantidade de eosinófilos, de hemácias, o percentual de hematócrito, e a concentração de hemoglobina significativamente maior quando comparadas ao grupo tratado com DETC ($p < 0.05$) (Tabela 1 e Figura 2A-D). As quantidades de leucócitos totais, de segmentados, linfócitos, monócitos e de plaquetas não sofreram variação significativa entre os grupos e continuaram dentro dos padrões normais para a espécie (Tabela 1 e Figura Suplementar 1 e 2). A análise dos parâmetros bioquímicos demonstrou que os níveis de ALT aumentaram em ambos os grupos durante o tratamento, principalmente no dia 30, mantendo-se acima dos valores adequados para a espécie (Tabela 1, Figura 2E e Figura Suplementar 1 e 2). A concentração sérica das proteínas totais, de albumina, os níveis de fosfatase alcalina, de creatinina, e os de ureia tiveram poucas variações durante o experimento, permanecendo dentro dos valores normais durante todo o experimento em praticamente todos os animais do experimento (Tabela 1 e Figura Suplementar 1 e 2).

Tabela 1. Perfil com avaliação hematológica, bioquímica, clínica e carga parasitária de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* antes (dia 0) e durante (dias 15 e 30) o tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia); Mediana seguida de interquartil.

PARAMETERS	(REF. VALUE)	Day 0		Day 15		Day 30	
		DETC (n=8) median (IQR)	ALOPURINOL (n=8) median (IQR)	DETC (n=8) median (IQR)	ALOPURINOL (n=8) median (IQR)	DETC (n=8) median (IQR)	ALOPURINOL (n=8) median (IQR)
HEMATOLOGY¹							
LEUKOC. TOT. (Cel/uL)	6.000 - 17.000	13550 (9800-16125)	11600 (9500-15225)	11300 (9125-14750)	11750 (8325-13775)	9350 (70,25-13375)	11850 (10875-13600)
BASOPHILS	0	0	0	0	0	0	0
EOSINOPHILS*	100 - 1.250	543 (0,0-1264)	1096 (528-2344)	382 (189-732)	1030 (628,5-1596)	204,5 (0,0-819,8)	846 (717-1298)
MYELOCYTES	0	0	0	0	0	0	0
METAMYELOCYTES	0	0	0	0	0	0	0
BAND CELLS	0	0	0	0	0	0	0
SEGMENTED	3.000 - 11.500	9315 (6860-11667)	8984 (6296-9488)	8181 (6993-9655)	8698 (7686-10676)	7210 (4211-8881)	8199 (7540-10150)
LYMPHOCYTES	1.000 - 4.800	2456 (1854-4040)	1562 (758,5-2022)	2366 (1867-4849)	1829 (1299-2376)	2047 (1245-4279)	2044 (1104-2160)
MONOCYTE	150 - 1.350	215,5 (23,25-421)	128 (15-349,5)	308 (128,5-392-3)	289 (145,5-457)	115 (7-425,8)	331 (148,5-539)
RBC X 10⁶/UI *	5,5 - 8,5	5,925 (4,96-6,84)	6,45 (6,36-6,93)	5,57 (4,53-6,91)	7,215 (6,78-7,885)	5,63 (5,04-7,56)	7,595 (7,31-7,94)
HEMATOCRIT (%) *	37 - 55	38,45(31,75-43,20)	43,3 (39,95-45,7)	36,3 (28,25-42,63)	48,35 (43,8-50,75)	36,2 (33,18-44,95)	49,7 (47,93-51)
HEMOGLOBIN (g/dL) *	12 - 18	12,15 (9,6-13,1)	13,3 (12,48-14,13)	11,7 (9,05-14,1)	16,15 (14,3-17,18)	12,3 (10,58-14,2)	16,95 (15,9-17,85)
MCV	60 - 77	63,45 (62,55-66,03)	66,25 (62,23-68,45)	62,05 (60,73-64,60)	63,2 (61,45-66,6)	63 (60,8-64,6)	63,6 (61,58-67,23)
MCHC *	32 - 36	32 (32-32,5)	32 (32-32,78)	32,05 (32-33,2)	33,15 (32,93-33,88)	32,25 (31,85-32,6)	32,7 (32,5-33,53)
RDW	14,0 - 17,0	15,35 (14,93-16,83)	14,7 (14,33-16,05)	15,3 (14,72-16,15)	14,55 (14,3-15,7)	15,25 (14,7-16,23)	14,35 (14,05-15,20)
PLATES X 10³/uL	200 - 500	114,5 (62,75-181)	193 (146,8-206,8)	179 (107,3-325,3)	153,5 (128,8-213)	103 (77-238,8)	183 (136,8-209,5)
MPV	6,7 - 11,1	7,7 (7,3-8,55)	7,9 (7,32-9,57)	7,95 (7,67-8,25)	7,75 (7,25-9,12)	8,15 (7,65-8,7)	7,7 (7,35-9,6)
BIOCHEMICAL²							
ALKAL. PHOSP. (U/L) *	20,0 - 156,0	41,5 (34,25-46)	68,5 (56,25-73,75)	40 (36-61,5)	54,5 (40,25-69,25)	77,5 (49,5-87,5)	72 (67-78,5)
ALT (U/L) *	4,8 - 24,0	24 (18,25-35)	29 (18,75-32,50)	22,5 (18,5-35,25)	39,5 (28,5-42,5)	79,5 (68-124,5)	56,5 (34-76)
ALBUMIN (g/dL) *	2,6 - 3,3	4,35 (3,67-4,9)	4,15 (3,3-5,05)	2,65 (2,22-2,77)	2,65 (2,6-3,35)	2,5 (2,3-3,02)	3,35 (3,02-3,87)
TOTAL PROT. (g/dL) *	5,4 - 7,1	10,1 (8,35-10,65)	9 (8,2-9,27)	7,15 (6,7-9,45)	7,4 (6,77-7,87)	7,75 (7,27-9,75)	7,95 (7,65-8,4)
CREATININE (mg/dL) *	0,5 - 1,5	1,095 (0,89-1,25)	1,245 (1,06-1,5)	0,865 (0,78-1,02)	0,915 (0,73-1,13)	0,925 (0,78-1,24)	1,15 (0,95-1,31)
UREA (mg/dL) *	21,4 - 59,92	28,5 (22-35,25)	40,5 (30,25-62,25)	23 (18,75-26,5)	26 (20,5-30)	39 (33-45,5)	42 (38,25-45,75)

OTHERS

CLINICAL SCORE	-	4,5 (2,25-6)	4,5 (2,25-5,75)	3 (2,25-4)	3,5 (3-5,75)	3 (2,25-4)	3,5 (3-5,5)
PARASITE LOAD	-	2,898 (0,14-38,56)	6,382 (0,15-104,5)	0,1281 (0,0-2,44)	1,751 (0,21-24,08)	4,975 (0,03-36,6)	6,621 (0,0-15,43)

¹Jain, N. C. (1996)

² Kaneko, (1997)

* p<0,05

TOTAL LEUKOC. - TOTAL LEUKOCYTES

RBC - RED BLOOD CELLS

MCV - MEAN CORPUSCULAR VOLUME

MCHC - MEAN CORPUSCULAR HEMOGLOBIN CONCENTRATION

RDW - RED CELL DISTRIBUTION WIDTH

ALKAL. FOS. - ALKALINE PHOSPHATASE

ALT - ALANINE AMINOTRANSFERASE

TOTAL PROT. - TOTAL PROTEINS

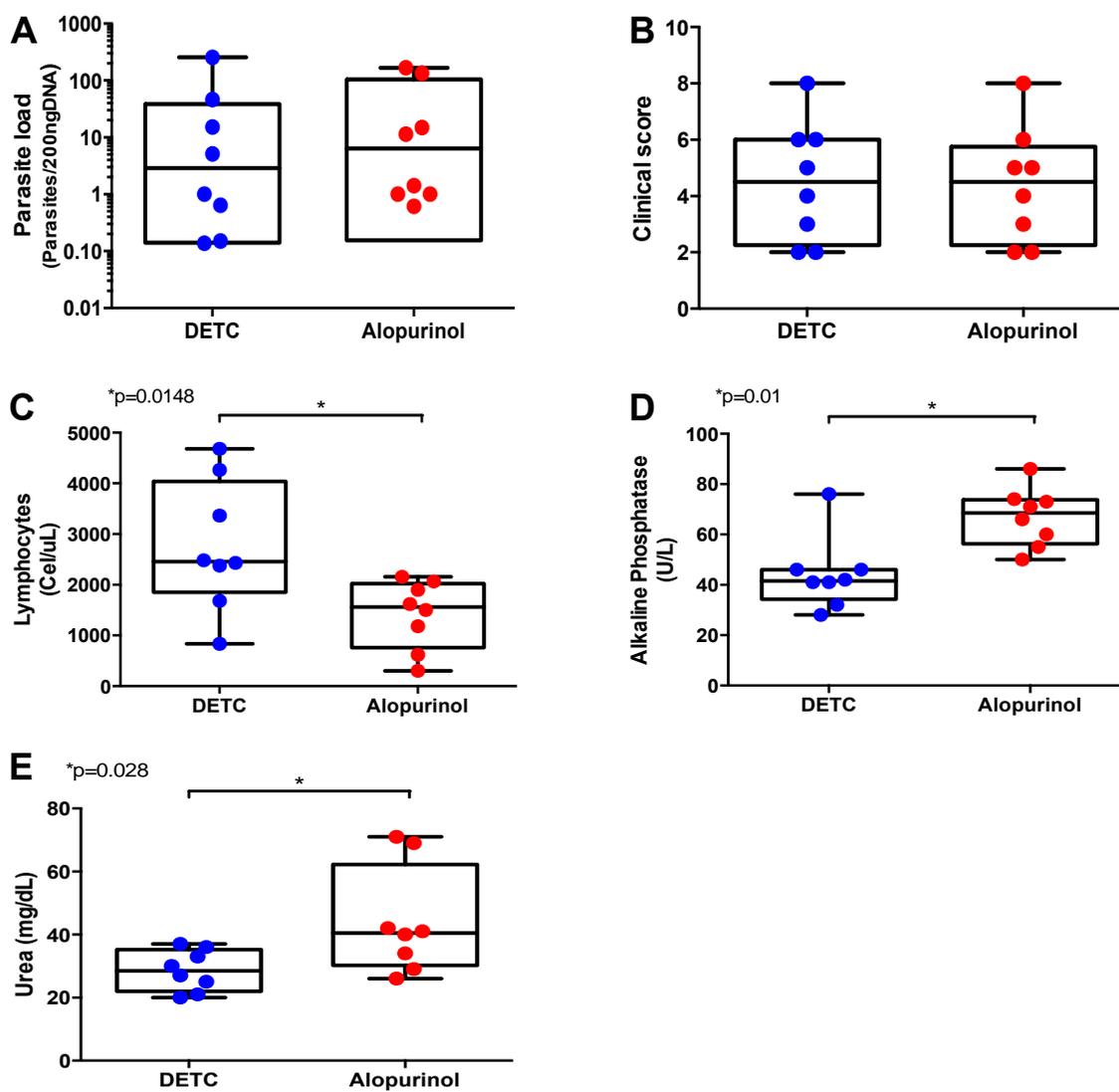


Figura 1. Parâmetros avaliados antes serem submetidos ao tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia) de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. **A**, Carga parasitária (parasitos em 200ng de DNA). **B** – escore clínico; **C** – quantidade de linfócitos (células/ μ L); **D** – níveis de fosfatase alcalina (unidades/L); **E** – Níveis de ureia. *Testes Mann Whitney.

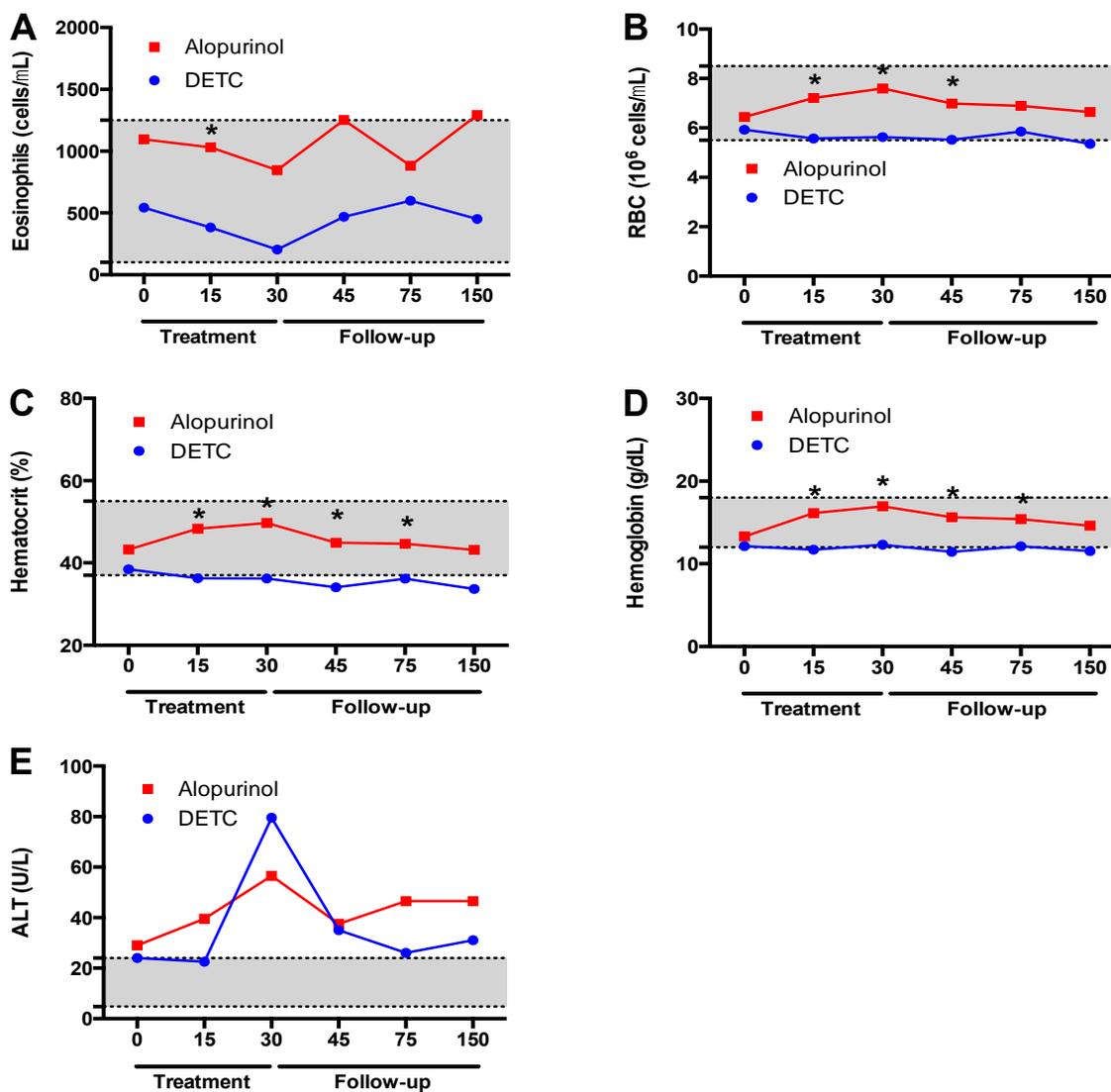


Figura 2. Parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) serem submetidos ao tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia), de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. **A**, Eosinófilos (células/ μ L); **B** – Hemácias (10^6 células/ μ L); **C** – Hematócrito (percentual); **D** – concentração de hemoglobina (g/dL); **E** – Níveis de Alanina aminotransferase (unidades/L). Faixa cinza – limites de normalidade de cada parâmetro (Jain, 1996; Kaneko, 1997). *Testes Mann Whitney. *Two way ANOVA.

6.3.3 Avaliação da carga parasitária no linfonodo dos cães durante e após o tratamento

Os dois grupos apresentaram uma carga parasitária relativamente baixa durante todo o período do estudo, com mediana sempre abaixo de 10 parasitas/200ng de DNA (Figura 3A). Ressalta-se que alguns animais de ambos os grupos apresentaram picos de parasitos no linfonodo superiores a 100 parasitas/200ng de DNA (Tabela 1 e 2; Figura 3B). Contudo, não houve diferença significativa na carga parasitária entre os dois grupos estudados ao longo do tempo.

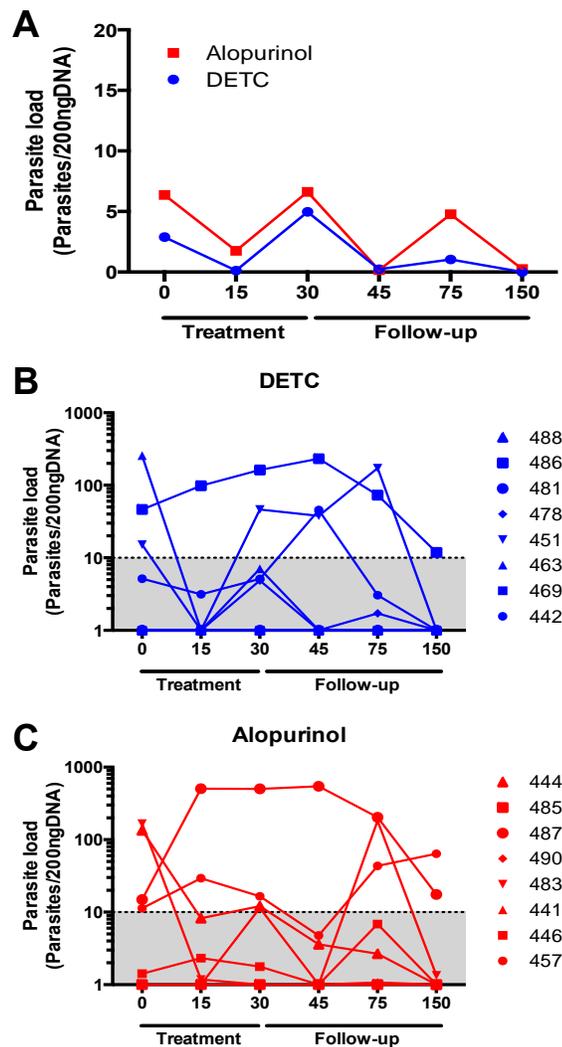


Figura 3. Carga parasitária no aspirado de linfonodo de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) serem submetidos ao tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia). **A** – Mediana dos grupos, **B** – Valores de cada animal tratado com DETC; **C** – Valores de cada animal tratado com Alopurinol; Faixa cinza – variação da mediana de cada grupo. *Two way ANOVA.

6.3.4 Avaliação clínica ao longo do tempo dos cães tratados com DETC ou Alopurinol

Os cães infectados com *L. infantum* apresentam um quadro clínico variado de difícil caracterização e associação com a evolução da doença. Para isso, Manna *et al.* (2009a) desenvolveram um escore clínico que unifica os diversos sinais, atribuindo uma escala de progressão da doença. A avaliação dos sinais clínicos utilizada para definir o escore clínico está resumida na ficha de avaliação (apêndice I) e na tabela suplementar 1 (apêndice II). Considerando a grande distribuição do escore clínico entre os animais dentro dos grupos (Figura 4A e 4B), foi criada uma linha basal utilizando a variação clínica entre todos os animais em todos os pontos (linha basal do escore clínico = 4,5) (Figura 4C e 4D). Assim, a análise das figuras 4A-D demonstra que houve uma queda acentuada do escore clínico dos cães do grupo DETC durante o período de tratamento, mantendo-se próximo ou abaixo dos níveis iniciais durante o acompanhamento. A partir deste limiar basal, os animais foram divididos em dois grupos: um grupo com escore que variou abaixo do limiar basal (sucesso terapêutico) (Figura 4E) e outro grupo com escore que variou acima do limiar basal (falha terapêutica) (Figura 4F). Os resultados gráficos demonstraram uma alta variação da ação da droga no grupo de animais tratados com Alopurinol, apresentando um índice estatisticamente significativo maior de falha terapêutica no grupo tratado com alopurinol quando comparado com o grupo tratado com DETC (Figura 4F).

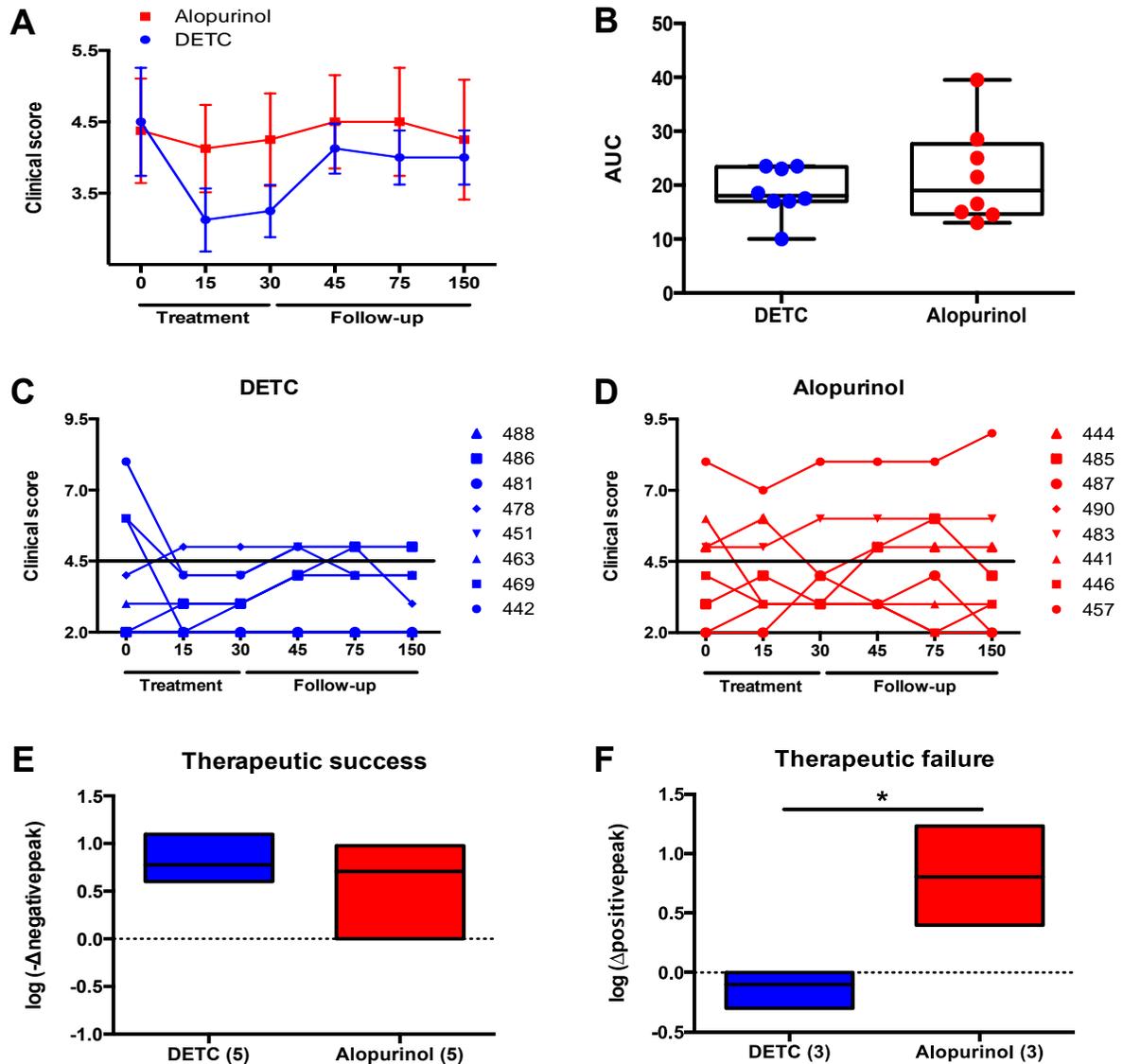


Figura 4. Influência do tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia) no escore clínico de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Two way ANOVA * $p < 0,05$. **A** – Mediana do escore clínico dos cães antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) o tratamento; **B** – área sob a curva (area under curve – AUC), mediana, cada ponto representa um animal; **C** e **D** – Escore clínico de todos os animais antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) serem submetidos ao tratamento com DETC ou Alopurinol, respectivamente, com linha de basal do escore clínico, coluna da direita representa a identificação de cada animal; **E** e **F** – grupos de acordo com a eficiência terapêutica, sucesso e falha, respectivamente.

6.3.5 Sobrevivência ao longo do tempo dos cães tratados com DETC ou Alopurinol

Depois do acompanhamento, esses cães foram incluídos em outro projeto (Protocolo nº 93/2015 - CEUA/UFPI) e mantidos em observação, sem sofrer nenhum tipo de intervenção, permitindo a realização de avaliações até dois anos do início do tratamento. Após dois anos de acompanhamento, foi observada a morte de apenas três animais tratados com DETC (3/8), enquanto foi observada a morte de cinco animais tratados com alopurinol (5/8) (Figura 5A e 5B), sugerindo um aumento da sobrevivência nos cães tratados com DETC. Adicionalmente, os cães que sobreviveram foram submetidos a testes sorológicos (TR DPP®/Bio-Manguinhos) e parasitológicos (esfregaço ou cultura de aspirado de medula e linfonodo) (Tabela 3). Nenhum dos cinco cães tratados com DETC sobreviventes apresentou teste parasitológico positivo para *Leishmania spp.* (0/5), enquanto um dos três cães tratados com alopurinol sobreviventes foi positivo (1/3), sugerindo uma ação leishmanicida maior do DETC (Tabela 3). Por fim, quatro animais tratados com DETC apresentaram resultados positivos para o teste sorológico (4/5), enquanto apenas um animal tratado com Alopurinol teve teste positivo (1/3), sugerindo uma melhora na resposta imune através da produção de anticorpos anti-leishmania dos cães tratados com DETC (Tabela 3). Assim, mesmo realizando um tratamento de curta duração, foi possível observar uma ação mais eficaz do DETC ao longo de dois anos.

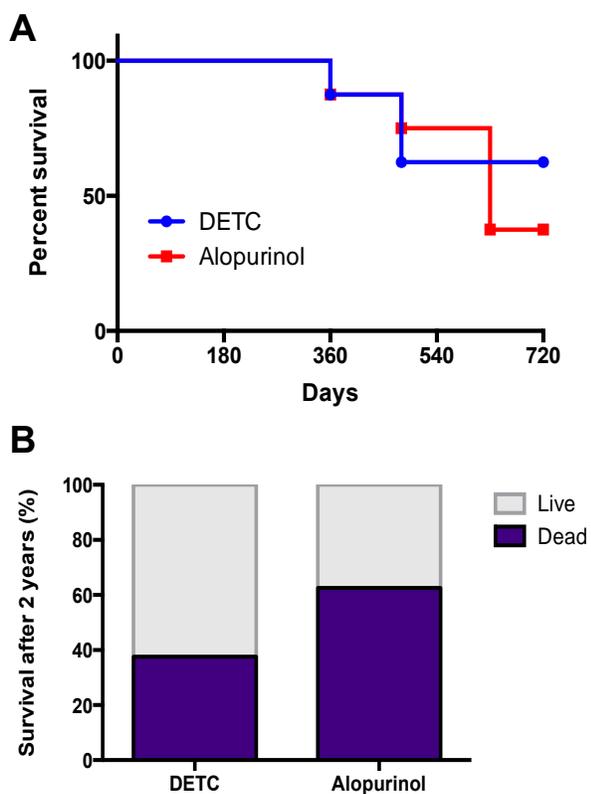


Figura 5. Sobrevivência de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* após tratamento DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia). A – Curva de sobrevivência durante 720 dias de acompanhamento; B – percentual de sobrevivência após 720 dias de acompanhamento.

Tabela 3. Resultado de testes sorológicos e parasitológicos de oito cães após o tratamento com DETC ou Alopurinol de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.

TREATMENT	DOG (Id)	SEROLOGICAL		PARASITOLOGICAL			
		DPP	SMEAR		CULTURE		
			Bone marrow	Linfonod	Bone marrow	Linfonod	
DETC	442	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	
	463	POS	NEG	-	NEG	-	
	451	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	
	478	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	
	481	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
ALOPURINOL	446	NEG	POS	-	NEG	-	
	441	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
	490	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	

6.4 DISCUSSÃO

O tratamento das leishmanioses tem sido bastante estudado nas últimas duas décadas. Diversos trabalhos já demonstraram episódios de falhas terapêuticas na leishmaniose tegumentar e visceral humana (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; ROATT *et al.*, 2014). Na doença visceral canina (LVC) essa falha terapêutica é ainda mais frequente. Os tratamentos empregados apresentam limitações na destruição do parasito em diferentes tecidos, e, conseqüentemente, na melhora clínica dos animais, ocorrendo recidivas frequentes (BANETH; SHAW, 2002; NOLI; AUXILIA, 2005; MANNA *et al.*, 2009b), por isso a necessidade do desenvolvimento de fármacos mais eficazes. Neste estudo, o tratamento com DETC contribuiu para uma melhora clínica dos animais, diminuindo as chances de óbito em comparação com a droga de referência, Alopurinol.

Um dos principais cuidados desse estudo foi com a segurança da administração dos fármacos para os animais. Como o alopurinol já vem sendo utilizado há bastante tempo com muita segurança (KOUTINAS *et al.*, 2001; MANNA *et al.*, 2008b), as preocupações tiveram como foco no uso do DETC. Apesar dos dados publicados não evidenciarem efeitos deletérios da utilização do fármaco abaixo da dosagem de 300mg/Kg/dia (EPA, 2009; SUNDERMAN *et al.*, 1967), ao iniciarmos a administração do fármaco observou-se a ocorrência de vômito em alguns animais. Com a intenção de reduzir esses efeitos, no ensaio atual a dose foi reduzida de 100mg/Kg/dia para 50mg/Kg/dia. Com isso, os vômitos passaram a ocorrer de forma irregular e pontual, com alguns animais apresentando um ou dois episódios durante todo o tratamento. Além de vômito fazer parte das reações adversas da administração do DETC e ser um dos sinais clínicos da LVC (WOERLY *et al.*, 2009), sua ocorrência também pode ser atribuída ao rompimento das capsulas nas porções superiores do trato digestivo (cavidade oral, esôfago e estômago), estimulando o surgimento da êmese.

Poucos trabalhos avaliam a ação de fármacos acompanhando o perfil hematológico e bioquímico, carga parasitária e de parâmetros clínicos dos animais (MANNA *et al.*, 2015). Neste estudo, nós avaliamos todos estes parâmetros dentro de uma cinética de pelo menos 5 meses para comparar a ação do DETC e Alopurinol na LVC.

A maioria dos parâmetros celulares (monócitos, eosinófilos, linfócitos, segmentados e hemácias) avaliados se mantiveram dentro dos limites de normalidade durante todo tratamento e acompanhamento, com exceção dos valores de plaqueta que permaneceram abaixo dos valores normais em ambos os grupos. Vários autores também encontraram esse achado após o tratamento com outros fármacos (BIANCIARDI *et al.*, 2004; WOERLY *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2014). Por ser uma doença que tem como característica quadros de hemorragia, essa diminuição pode ser uma das causas desse desequilíbrio hematológico (COSTA-VAL *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2012). Apesar da diferença significativa dos níveis hematimétricos (Figuras 2B-D e Figura suplementar 1G-I e Figura suplementar 2G-I) entre os dois grupos, ambos estavam dentro da faixa de normalidade.

Dentre todos os parâmetros bioquímicos analisados, apenas os níveis de ALT permaneceram acima dos valores normais em ambos os tratamentos (Figura 2E, Figura suplementar 1P e Figura suplementar 2P). Isso indica uma possível deficiência na função hepática (CASTRO *et al.*, 2012) já observada em outros ensaios de tratamento da LVC, onde houve aumento dessa enzima (KOUTINAS *et al.*, 2001).

A redução na carga parasitária é um importante marcador de sucesso terapêutico em diversos estudos (KOUTINAS *et al.*, 2001; MANNA *et al.*, 2008; MANNA *et al.*, 2009b; JAMSHIDI *et al.*, 2012). Nossos animais não apresentavam altas cargas parasitárias no início da terapia e permaneceram assim até o final do acompanhamento, sugerindo pelo menos um controle da carga parasitária por ambos os tratamentos. Adicionalmente, todos os cães tratados com DETC apresentaram teste parasitológico negativo após dois anos do início da terapia. Apesar da redução ou controle da carga parasitária, o grande problema dos protocolos até o momento são as constantes recidivas clínicas dos animais após o fim do tratamento (VEXENAT *et al.*, 1998; KOUTINAS *et al.*, 2001; GUARGA *et al.*, 2002; JOÃO *et al.*, 2006; IKEDA-GARCIA *et al.*, 2007; MANNA *et al.*, 2008; MANNA *et al.*, 2009a; BORJA-CABRERA *et al.*, 2010). O acompanhamento dos animais por dois anos neste estudo, demonstrou uma melhora clínica importante (Figura 4A e 4B) e maior sobrevivência (Figura 5A e 5B) dos animais tratados com DETC.

De acordo com as modificações no estado clínico dos cães, os tratamentos se dividem naqueles que tem pouca ação na mudança do perfil clínico dos cães

(BIANCIARDI *et al.*, 2004; PENNISI *et al.*, 2008) e os outros levam a uma melhora clínica considerável (KOUTINAS *et al.*, 2001; BANETH; SHAW, 2002; GUARGA *et al.*, 2002; IKEDA-GARCIA *et al.*, 2007; MANNA *et al.*, 2008; GÓMEZ-OCHOA *et al.*, 2009; BORJA-CABRERA *et al.*, 2010). Em nosso estudo utilizamos apenas um ciclo de tratamento de 30 dias, mesmo assim, foi observada uma melhora clínica significativa nos animais tratados com DETC. Manna *et al.* (2009a) demonstraram que animais que apresentam alta carga parasitária possuíam muitos sinais clínicos, ou seja, uma melhora clínica normalmente está relacionada com a diminuição da carga parasitária. Apesar de não termos observado uma redução significativa da carga parasitária, os resultados negativos nos testes parasitológicos pode ser um indicativo dessa resposta.

O tempo de tratamento relativamente curto e a pequena quantidade de animais podem limitar a aplicação dos resultados encontrados, sendo necessários mais testes para confirmar os efeitos do DETC contra a LVC. Apesar de não confrontarmos os resultados com um grupo controle, a comparação do tratamento com DETC com um fármaco referência evidenciou uma resposta semelhante entre os dois tratamentos.

Diante do exposto, podemos concluir que o uso do DETC no tratamento de cães naturalmente infectados contribuiu para o controle da evolução clínica dos animais de maneira mais eficiente que o alopurinol. Aliado a isso, apesar das pequenas mudanças provocadas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, o fato de haver uma proximidade entre os resultados dos dois tratamentos avaliados mostra que o DETC não levou a alterações fisiológicas relevantes que pudesse prejudicar ou levar a danos para os animais tratados. Devido à pequena quantidade de cães utilizada no estudo, são necessários novos estudos, com número maior de animais, para que o DETC seja confirmado como uma possível alternativa para o combate da LVC.

6.5 REFERÊNCIAS

- ADAMAMA-MORAITOU, K. K. *et al.* Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, p. 53-57, 2007.
- ALMEIDA LEAL, G. G. *et al.* Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, v. 205, p. 472-482, 2014.
- ALVAR. J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-12, 2012.
- ARAGÃO, L. V. O.; DOURADO, J. C. L.; PACHECO, J. J. Leishmaniose visceral em Teresina-PI 1995-2006. Avaliação da eliminação de cães soropositivos como medida de controle. [**Leishmaniose visceral in Teresina, pi. 1995 – 2006. Evaluation of elimination of dogs soropositivos as measure of control**]. (2010, August 24). Retrieved from <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0587-1.pdf>. 2008.
- BANETH, G *et al.* Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.**, v. 24, p. 324-330, 2008.
- BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 315-324, 2002.
- BERMAN, J. D. *et al.* Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. **Bull World Health Organ.**, v. 76, p. 25-32, 1998.
- BIANCIARDI, P. *et al.* The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v. 93, p. 486-492, 2004.

BORJA-CABRERA, G. P. *et al.* Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune® vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.28, p. 597-603, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** [*Vigilance manual and control of visceral leishmaniasis*]. Ministério da Saúde, Brasília, 120 pg, 1ªed, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. **Relatório de Situação - Piauí**. Ministério da Saúde, Brasília, 58 pp, 2009.

CARRIÓ, J.; PORTÚS, M. *In vitro* susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during *in vitro* or *in vitro* passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. **BMC Pharmacol.**, v. 2, p. 1-5, 2002.

CARVALHO, F. S. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* in dogs in Brazil: epidemiology, co-infection, and clinical aspects. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 62-73, 2015.

CASTRO, I. P. *et al.* Hepatic and proteic profile in dogs with visceral leishmaniasis. **Biosci. J.**, v. 28, p. 799-804, 2012.

CAVALCANTI, M. P. *et al.* The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **Vet. J.**, v. 182, p. 356-358, 2009.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in Leishmaniasis. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 2, p. 167-176, 2010.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 873-82, 2007.

CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 141, p. 539-543, 1997.

COSTA, C. H. N. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 223-228, 2001.

COSTA, C. H. N. *et al.* Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 997-1000, 2000.

COSTA-VAL, A. P. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet. J.**, v. 174, p. 636-643, 2007.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 111-126, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigm of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 48, p. 151–156, 2006.

DAS, V. N. *et al.* A controlled, randomized nonblinded clinical trial to assess the efficacy of amphotericin B deoxycholate as compared to pentamidine for the treatment of antimony unresponsive visceral leishmaniasis cases in Bihar, India. **Ther Clin Risk Manag.**, v. 5, n. 1, p.117-24, 2009.

DE LUNA, R. *et al.* Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. **J. Comp. Path.**, v. 122, p. 213-216. 2000.

DE MOURA, T. R. *et al.* Toward a novel experimental model of infection to study american cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect Immun.**, v. 73, p. 5827-5834, 2005.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. L. Forty years of visceral leishmaniasis in the state of Piauí: a review. **Rev. Inst. Med. Trop.** 53, 3-11, 2011.

FIGUEREDO, L. A. *et al.* Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*-infected dogs from Pernambuco, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, p. 418-420, 2012.

FREITAS, J. C. C. *et al.* Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, p. 24-29, 2012.

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

GUARGA, J. L. *et al.* Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 88, p. 13-20, 2002.

HIAM, A. *et al.* Microtubule target for new antileishmanial drugs based on ethyl 3-haloacetamidobenzoates. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v. 21, p. 305-312, 2006.

HÜBNER, L. *et al.* Enhancement of monocyte antimycobacterial activity by diethyldithiocarbamate (DTC). **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 13, p. 1067-1072, 1991.

IKEDA-GARCIA, F. A. *et al.* Hematological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 45, p. 68-74, 2008.

IKEDA-GARCIA, F. A. *et al.* Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Vet. Parasitol.**, v. 143, p. 254-259, 2007.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 417p.,1993.

JAMSHIDI, S. *et al.* Immunotherapy using autoclaved *L. major* antigens and *M. vaccae* with meglumine antimoniate, for the treatment of experimental canine visceral leishmaniasis. **Iranian J. Parasitol.**, v. 6, p. 26-34, 2011.

JOÃO, A. *et al.* Canine leishmaniasis. chemotherapy: dog's clinical condition and risk of *Leishmania* transmission. **J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v. 53, p. 540-545, 2006.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. **San Diego: Academic Press**, 5 ed., 932p., 1997.

KHOURI, R. *et al.* DETC induces *Leishmania* parasite killing in human *in vitro* and murine *in vitro* models: a promising therapeutic alternative in leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1-9, 2010.

KHOURI, R. *et al.* IFN- β Impairs Superoxide-Dependent Parasite Killing in Human Macrophages: Evidence for a Deleterious Role of SOD1 in Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, n. 182, 2525-253, 2009.

KHOURI, R. *et al.* SOD1 Plasma Level as a Biomarker for Therapeutic Failure in Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 210, n. 2010, p. 306-310, 2014.

KOUTINAS, A. F. *et al.* Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis (CVL) in Greece: a retrospective study of 158 spontaneous cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 35, p. 375-383, 1999.

KOUTINAS, A. F. *et al.* A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 98, p. 247-261, 2001.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New world leishmaniasis – The neotropical *Leishmania* species. In: Cox, F.E.G., Kreier, J.P., Wakelen, D., **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. England, London, 3^a ed., p. 241-266, 1998.

LEMESRE, J. L. *et al.* Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. **Vaccine**, v. 23, p. 2825–2840, 2005.

MAIA, C. *et al.* Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. **Acta Trop.**, v. 116, p. 193-199, 2010.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saude Publica**, v. 24, p. 2941-2947, 2008.

MANNA, L. *et al.* *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 142, p. 271-280, 2006.

MANNA, L. *et al.* Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet. J.**, v. 177, p. 279-282, 2008a.

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

MANNA, L. *et al.* Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res. Vet. Sci.**, v. 87, p. 76-78, 2009a.

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

MANNA, L. *et al.* Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus alopurinol. **Parasites & Vectors**, n° .8, v. 289, p. 1-9, 2015.

MARQUES, C. *et al.* Efficacy of the liposome trifluralin in the treatment of experimental canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 178, p. 133–37, 2008.

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

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 399-405, 2002.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Vet. Dermatol.**, v. 16, p. 213-232, 2005.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, L. *et al.* *In vitro* effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 30, p. 325-329, 2007.

PASSOS, S. R. *et al.* Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with furazolidone and domperidone. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 44, p. 463-465, 2014.

PENNISI, M. G. *et al.* Clinical efficacy of two different drug combinations for the treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Res. Commun.**, v. 32, p. 303-305, 2008.

PETERSEN, A. L. *et al.* 17-AAG kills intracellular *Leishmania amazonensis* while reducing inflammatory responses in infected macrophages. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. 1-11, 2012.

POLZIN, D. J. Insuficiência Renal Crônica [*Chronic Kidney Disease*]. In: Ettinger, S. J., FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, São Paulo, São Paulo, 1^a Ed. p. 2394- 2431, 1997.

REGUERA, R. M. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 227, p.98–114, 2016.

REISINGER, E. C. *et al.* Inhibition of HIV progression by dithiocarb. German DTC Study Group. **The Lancet**, v. 335, p. 679-682, 1990.

ROATT, B. M. *et al.* Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 272, 2014.

SANTOS, D. M. *et al.* Chemotherapeutic potential of 17-AAG against cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, p. 1-9, 2014.

SCHETTINI, D. A. *et al.* Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 269-272, 2003.

SHAW, J. J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 486-490, 1988.

SILVA, J. G. D. *et al.* Natural infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania sp.* in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cad. Saude Publica**, v. 23, p. 1715-1720, 2007.

SLAPPENDEL, R. J.; TESKE, E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime®) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. **Vet. Quart.**, v. 19, p. 10-13, 1997.

SOARES, M. R. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Trop.**, v. 117, p. 6-9, 2011.

SOLCÁ, M. S. *et al.* Circulating Biomarkers of Immune Activation, Oxidative Stress and Inflammation Characterize Severe Canine Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-7, 2016.

SUNDERMAN, F. W.; PAYNTER, O. E.; GEORGE, R. B. The effects of the protracted administration of the chelating agent, sodium diethyldithiocarbamate (dithiocarb). **Am. J. Med. Sci.**, v. 254, p. 24-34, 1967.

TODOLÍ, F. *et al.* Dynamics and predictive potential of antibodies against insect-derived recombinant *Leishmania infantum* proteins during chemotherapy of naturally infected dogs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 795-800, 2010.

TORRUS, D. *et al.* Fluconazole plus allopurinol in treatment of visceral leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 37, p. 1042-3, 1996.

TRAVI, B. L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. **Biomédica**. v. 34, p. 7-12, 2014

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Sodium diethyldithiocarbamate (CASRN 148-18-5). (2009, July 6). Retrieved from <http://www.epa.gov/iris/subst/0102.htm>.

VEXENAT, J. A. *et al.* Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidine (paromomycin). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 448-453, 1998.

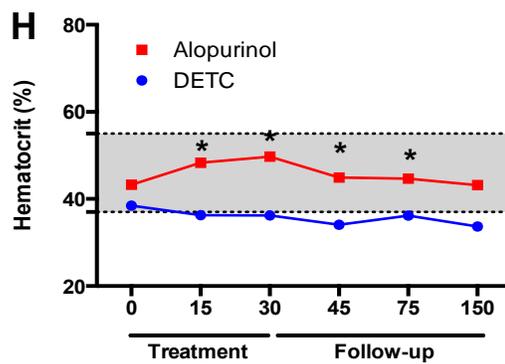
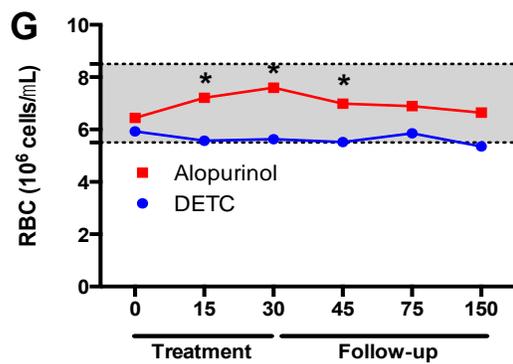
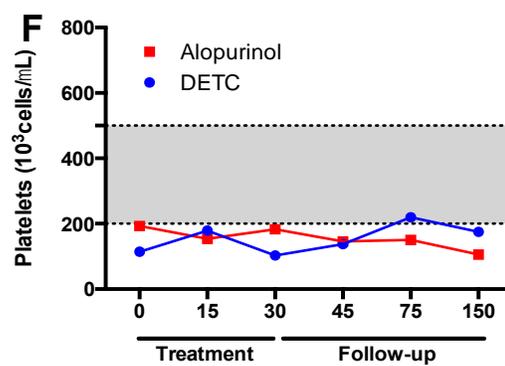
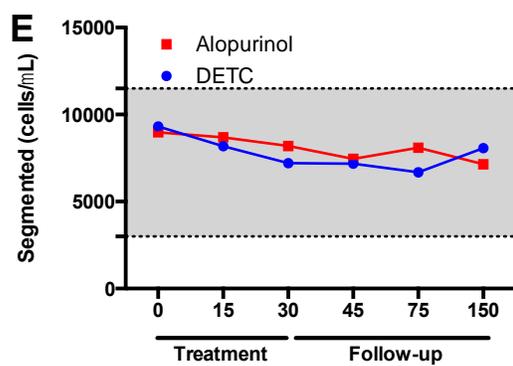
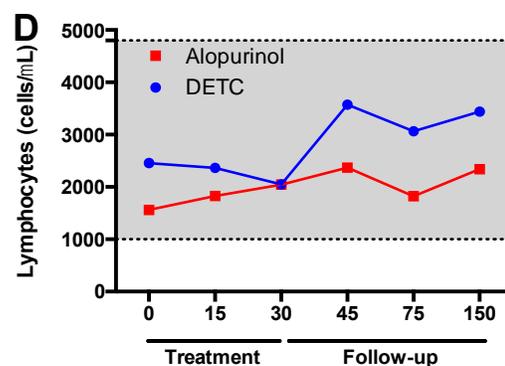
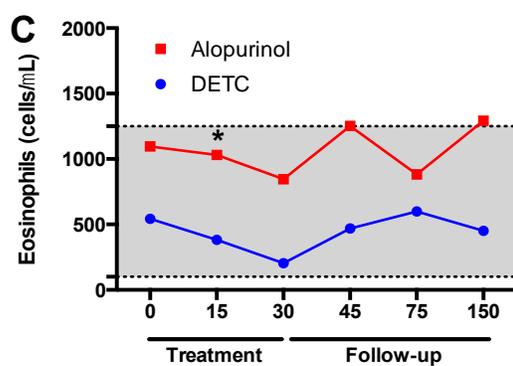
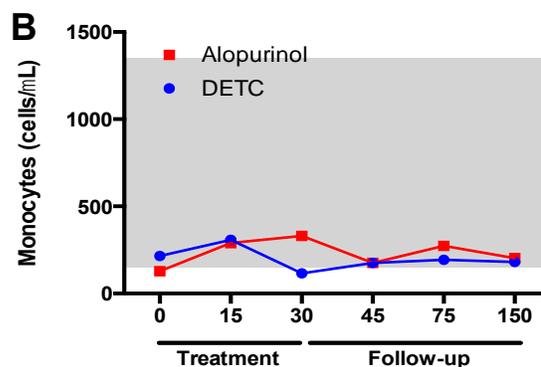
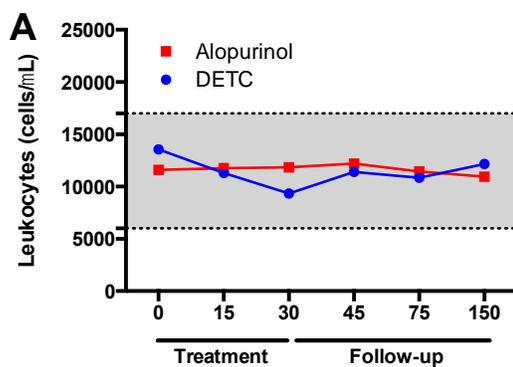
WALKER, E. M. Jr. *et al.* Effects of diethyldithiocarbamate and structural analogs in mice with systemic candidal infections. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 56, p. 253-263, 1987.

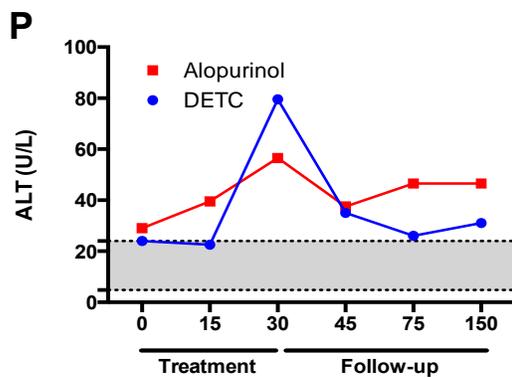
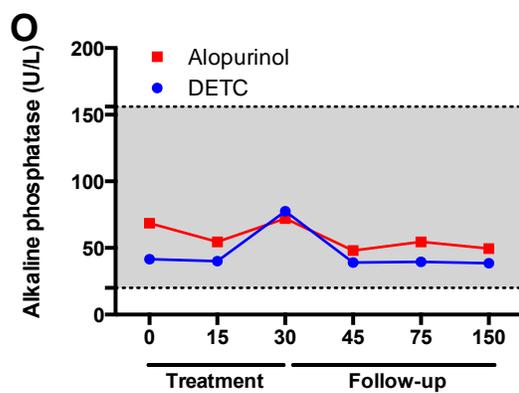
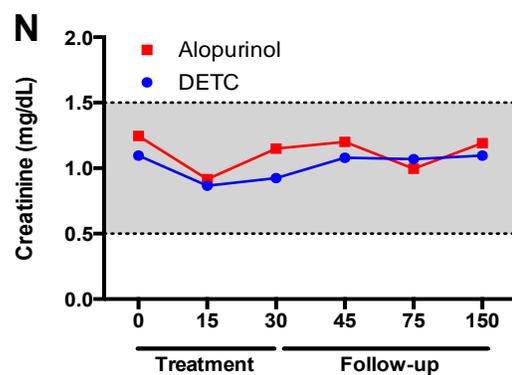
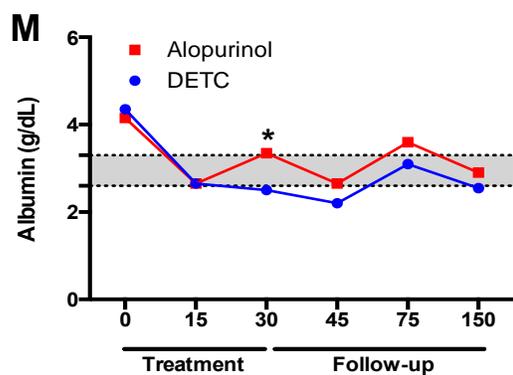
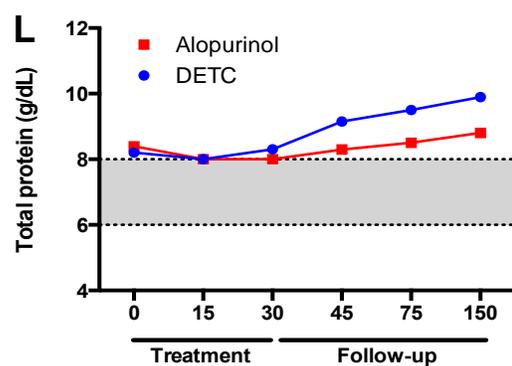
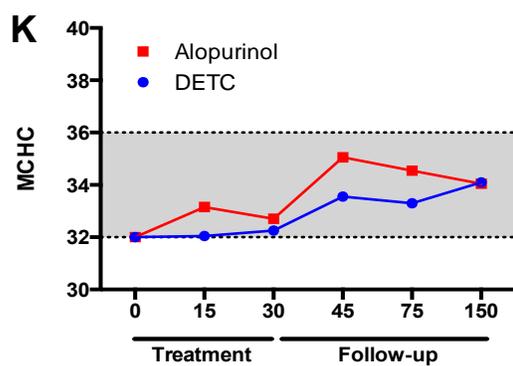
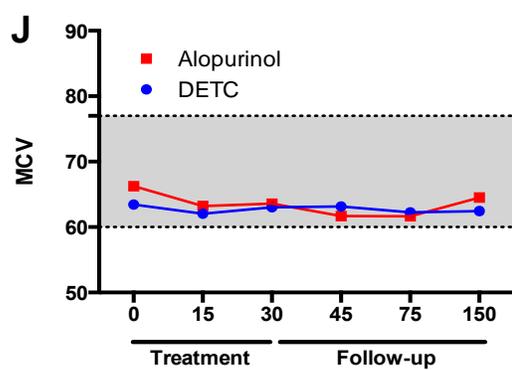
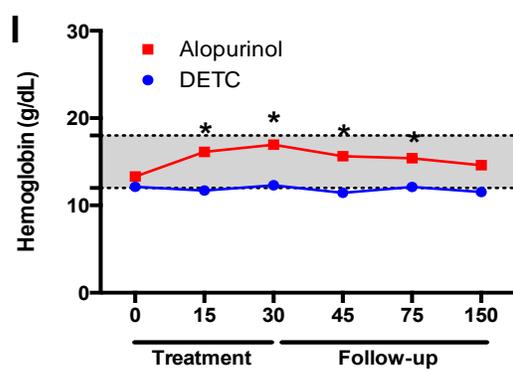
WALKER, S. *et al.* Amphotericin B in lipid emulsion: stability, compatibility, and *in vitro* antifungal activity. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 762-766, 1998.

WOERLY, V. *et al.* Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitol. Res.**, v. 105, p. 463-469, 2009.

WYLLIE, S. *et al.* The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. **Sci Transl Med.**, v. 1; n. 4, p. 1-16, 2012.

6.6 MATERIAL SUPPLEMENTAR





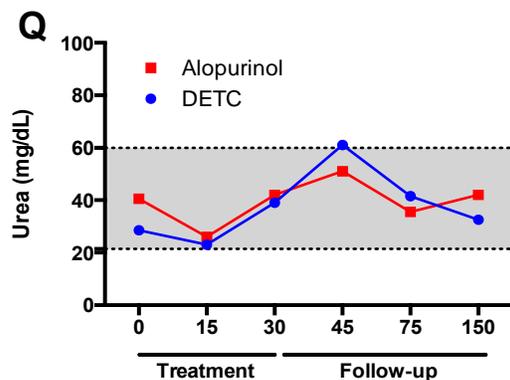
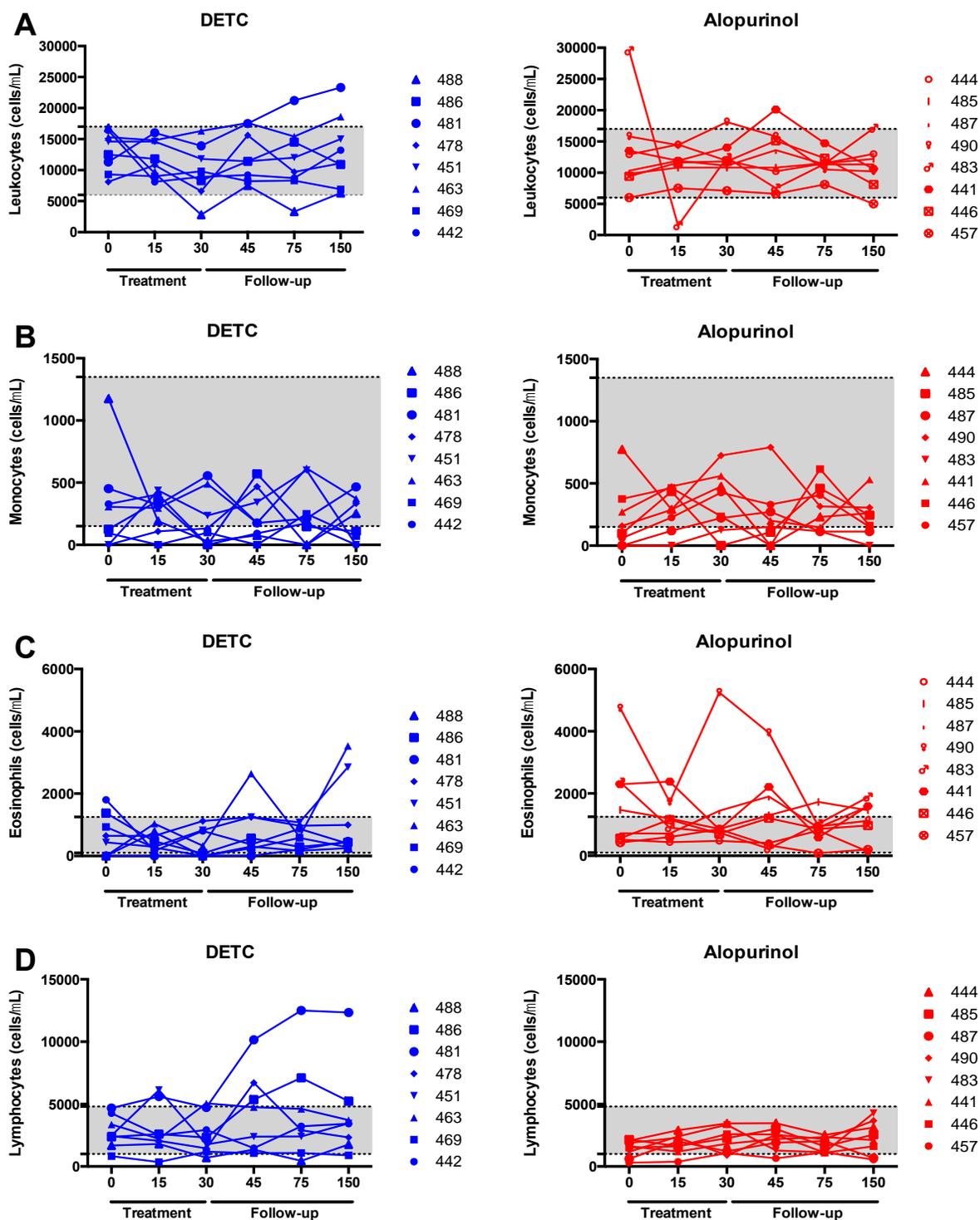
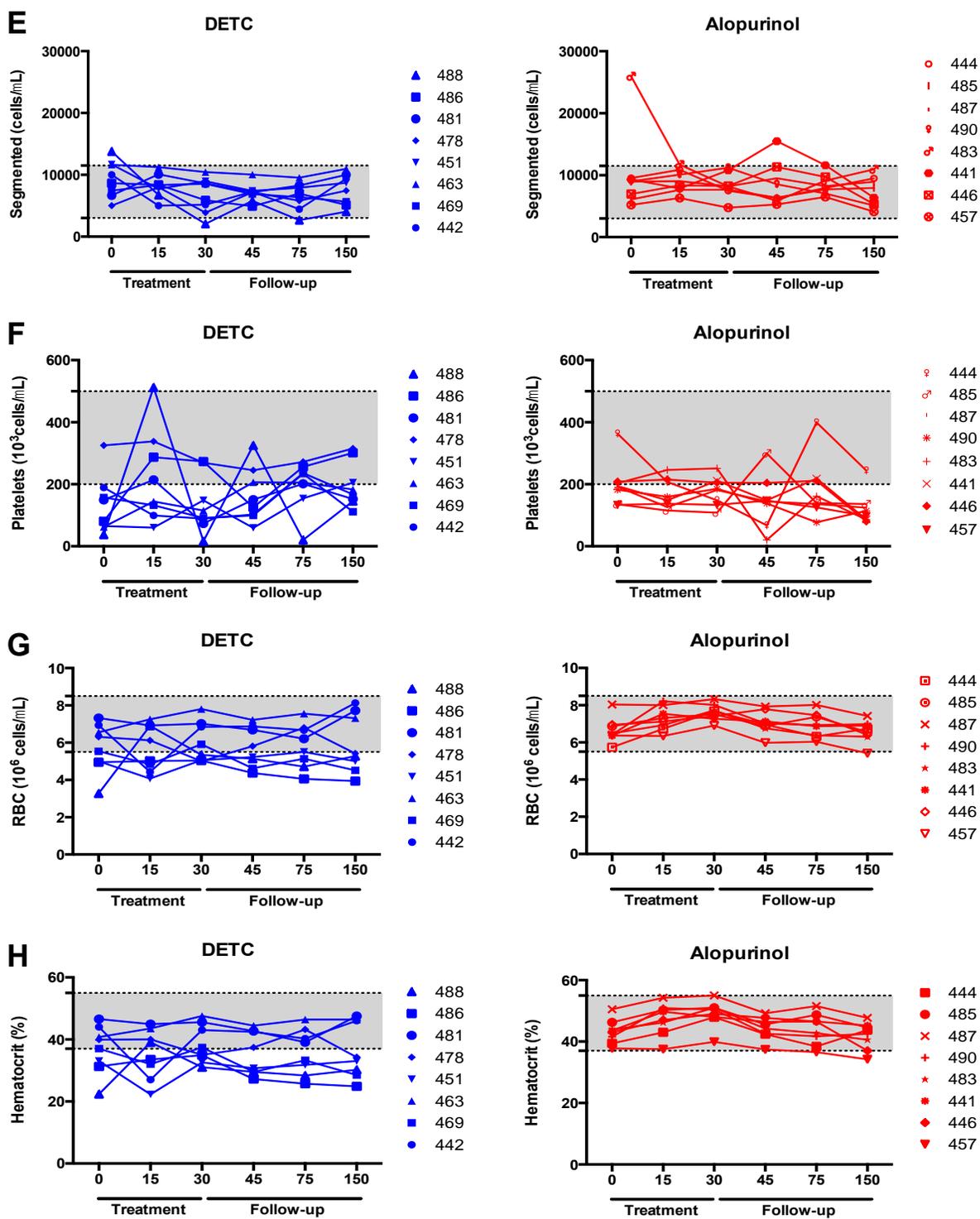
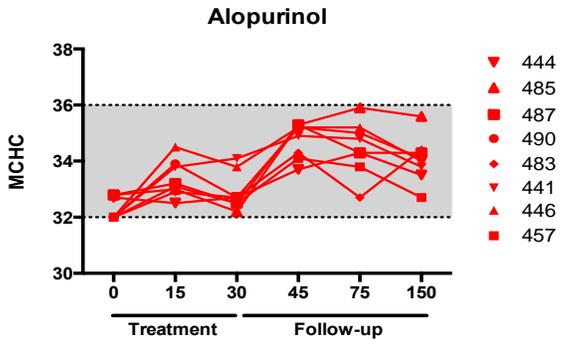
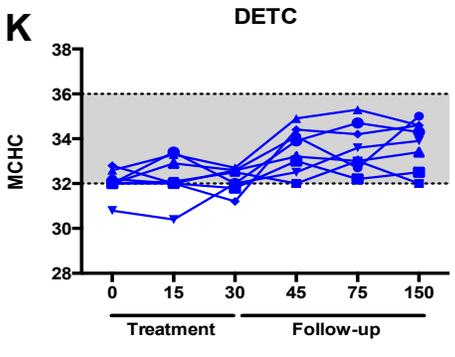
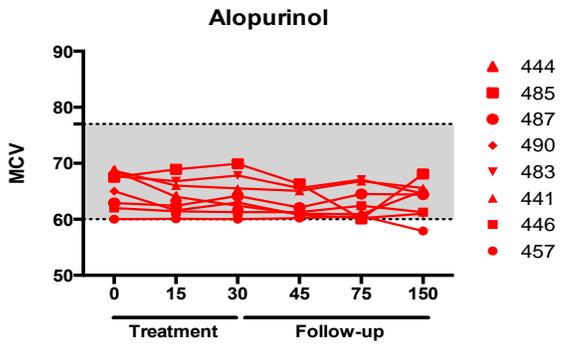
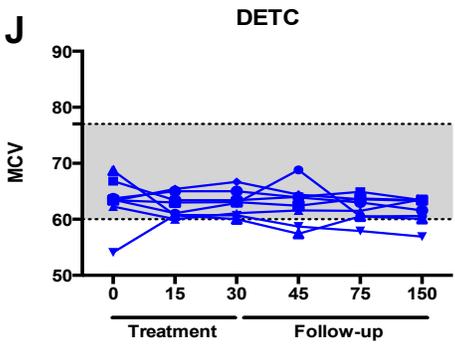
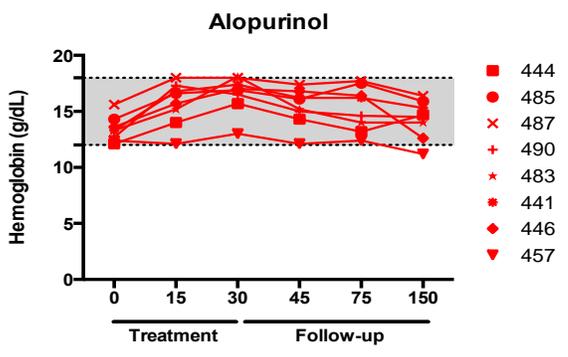
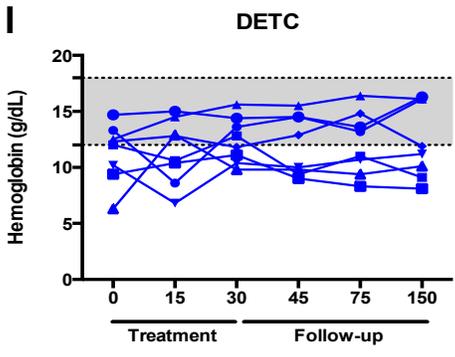
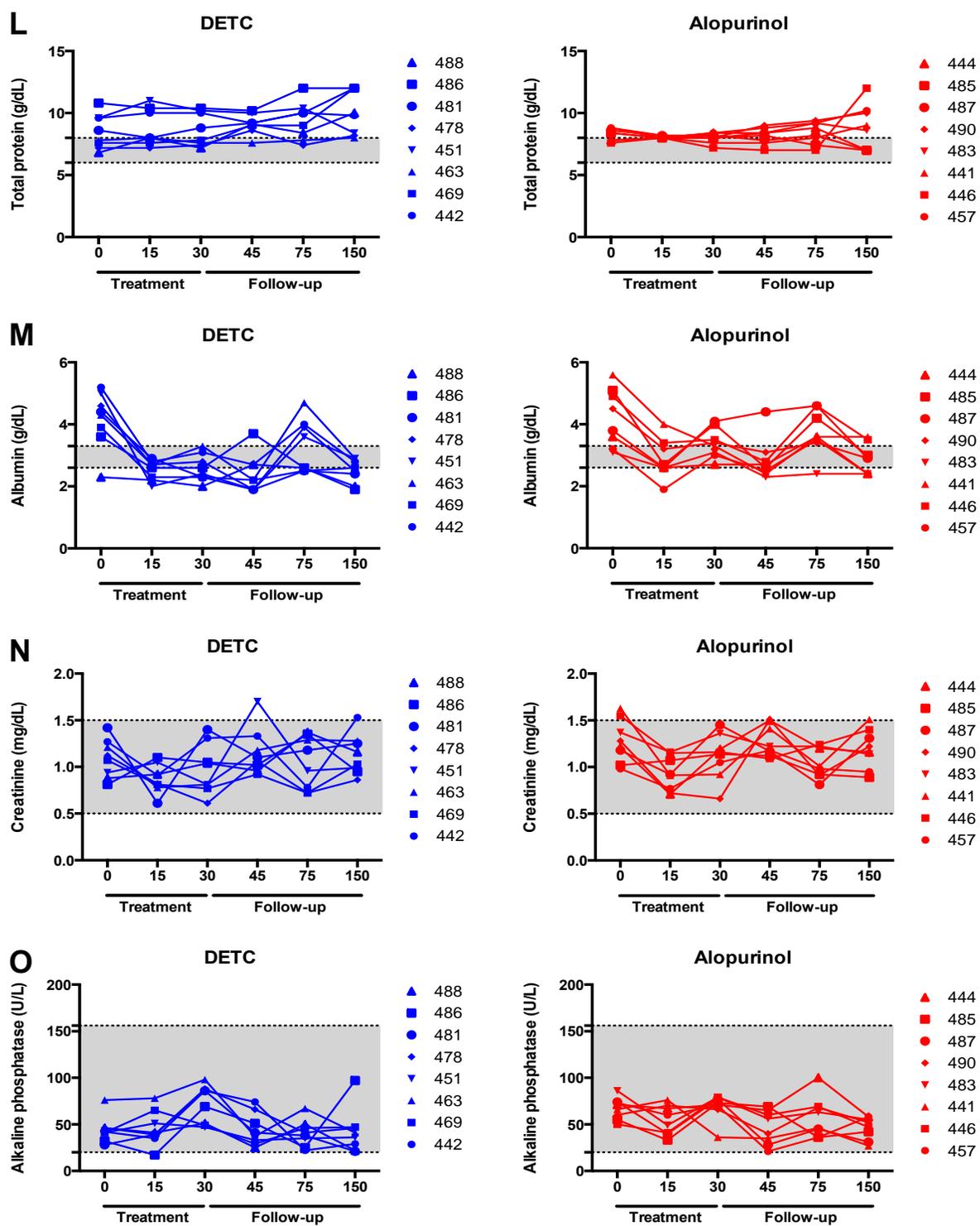


Figura suplementar 1. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* avaliados antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) serem submetidos ao tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia). Letras de A a E – resultados expressos em número absoluto de células. Plaquetas (Letra F) expressa em $\times 10^3/L$; Hemácias (Letra G) expressa em $\times 10^6/uL$. **A** – Leucócitos, **B** – Monócitos, **C** – Eosinófilos, **D** – Linfócitos, **E** – Segmentados, **F** – Plaquetas, **G** – Hemácias, **H** – Hematócrito, **I** – Hemoglobina; **J** – Volume globular médio (MCV), **K** – Concentração corpuscular média (MCHC), **L** – proteínas totais (g/dL), **M** – Albumina (g/dL), **N** – Creatina (mg/dL), **O** – Fosfatase alcalina (U/L), **P** – Alanina amino transferase (ALT) (U/L) e **Q** – Ureia (mg/dL). Faixa cinza – limites de normalidade de cada parâmetro (Jain, 1996; Kaneko, 1997. Resultados apresentados em mediana. *Two way ANOVA.









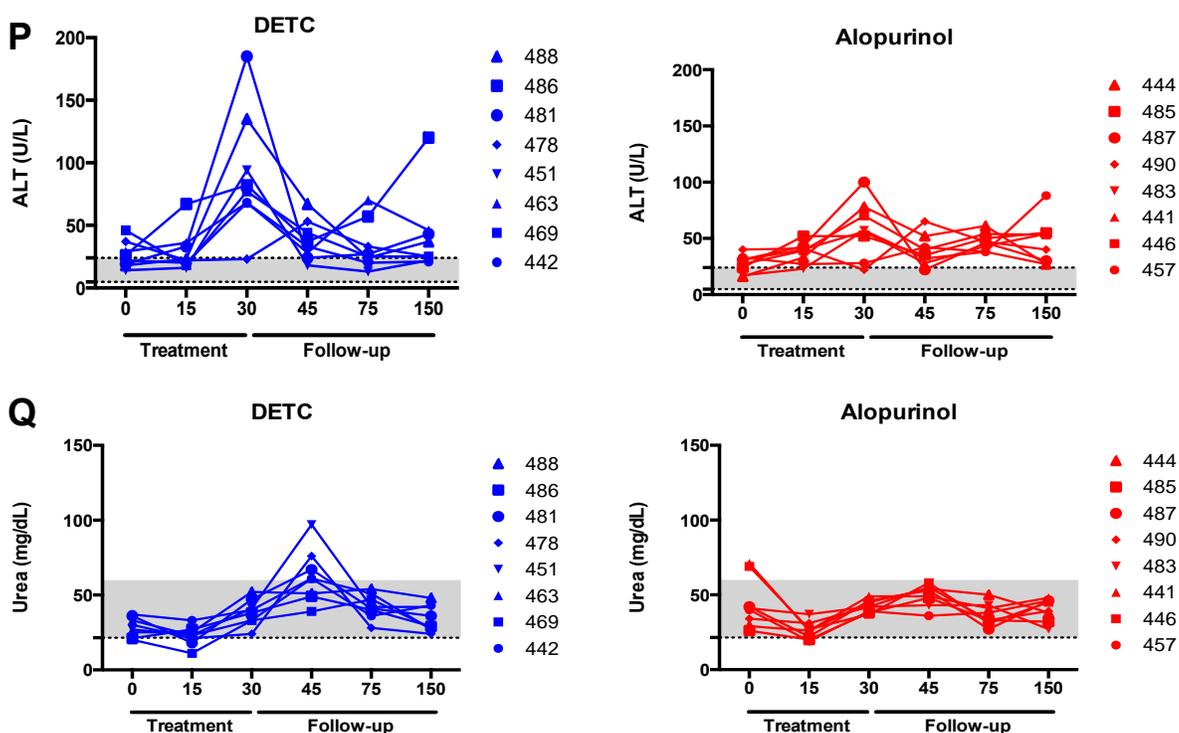


Figura suplementar 2. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* avaliados antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) serem submetidos ao tratamento com DETC (50mg/Kg/dia) (gráficos da coluna da esquerda) ou Alopurinol (20mg/Kg/dia) (gráficos da coluna da direita). Letras de A a E – resultados expressos em número absoluto de células. Plaquetas (Letra F) expressa em $\times 10^3/L$; Hemácias (Letra G) expressa em $\times 10^6/uL$. **A** – Leucócitos, **B** – Monócitos, **C** – Eosinófilos, **D** – Linfócitos, **E** – Segmentados, **F** – Plaquetas, **G** – Hemácias, **H** – Hematócrito, **I** – Hemoglobina; **J** – Volume globular médio (MCV), **K** – Concentração corpuscular média (MCHC), **L** – proteínas totais (g/dL), **M** – Albumina (g/dL), **N** – Creatina (mg/dL), **O** – Fosfatase alcalina (U/L), **P** – Alanina amino transferase (ALT) (U/L) e **Q** – Ureia (mg/dL). Faixa cinza – limites de normalidade de cada parâmetro (Jain, 1996; Kaneko, 1997). Cada animal está representado. *Two way ANOVA.

Ficha de avaliação clínica utilizada no estudo. (Adaptada de Manna *et al.*, 2009)

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA (LVC)

Data: _____; Nome do animal: _____ RG _____

Prop. _____; End. _____ Fone: _____

Amostra: _____ Sexo: _____ Raça: _____; Idade: _____

Estado geral: ativo () ; apático () Ectoparasitas: pulgas () ; Carrapatos () ; Outros _____

Parâmetros clínicos	Classificação			Observações
	Normal (0)	Magro (1)	Caquético (2)	
Estado nutricional	Normal (0)	Magro (1)	Caquético (2)	
Pelagem	Boa/ótima (0)	Regular (1)	Ruim (2)	
Unhas	Normais (0)	Aumentadas (1)		
Linfonodos	Normais (0)	Aumentados 1 par (1)	2 ou mais pares (2)	
Coloração de mucosas	Normais (0)	Pálidas (1)		
Lesão de orelha	Ausente (0)	Presença (1)		
Lesão lábio/focinho	Ausente (0)	Presença (1)		
Despigmentação de focinho	Ausente (0)	Presente (1)		
Lesão de pele	Ausente (0)	Presente (1)	Úlceras (2)	
Secreção ocular	Ausente (0)	Serosa, mucosa (1)	Muco purulento (2)	
Lesão de córnea	Ausente (0)	Presente (1)		
Blefarite	Ausente (0)	Presença (1)		
Sangramento	Ausente (0)	Presente (1)		
TOTAL DE PONTOS				
LÂMINAS:		CULTURA:		RIFI:

Tabela suplementar 01. Avaliação clínica de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* antes (dia 0), durante (dias 15 e 30) e após (dias 45, 75 e 150) serem submetidos ao tratamento com 50mg/Kg/dia DETC ou 20mg/Kg/dia. Expressos em número de animais, cada grupo com oito animais.

	Day	DETC					ALOPURINOL						
		0	15	30	45	75	150	0	15	30	45	75	150
Nutritional status													
	Normal	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Skinny	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cachectic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pelage													
	Good	5	8	8	8	8	8	6	8	8	8	8	8
	Regular	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	Bad	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nails													
	Normal	6	6	7	7	7	7	6	7	8	8	7	7
	Increased	2	2	1	1	1	1	2	1	0	0	1	1
Lymphadenomegaly													
	Normais	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Increased 1 pair	3	1	1	1	1	1	2	1	0	0	1	1
	2 ou more pair	4	6	6	7	6	7	6	7	8	8	7	7
Staining of mucus													
	Normais	6	8	6	1	4	4	8	7	6	2	4	3
	Pale	2	0	2	7	4	4	0	2	2	6	4	5
Ear lesions													
	Absent	8	8	8	8	7	6	8	8	8	8	7	8
	Present	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0
Lesions lips/muzzle													
	Absent	5	5	5	5	5	7	4	6	5	5	6	6
	Present	3	3	3	3	3	1	4	2	3	3	2	2
Depigmentation lips/muzzle													
	Absent	2	1	1	2	1	2	4	1	0	4	2	4
	Present	6	7	7	6	7	6	4	7	8	4	6	4
Skin lesion													
	Absent	6	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	8
	Present	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Ulcers	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Secretion eye													
	Absent	6	8	8	8	7	7	6	7	7	6	6	6
	Serous/mucous	2	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
	Mucopurulent	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Corneal injury													
	Absent	6	8	8	8	7	7	6	6	6	6	6	6
	Present	2	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2
Blepharitis													
	Absent	8	8	8	8	8	8	6	7	7	7	7	7
	Present	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	1
Bleeding													
	Absent	8	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	8
	Present	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Folha de rosto capítulo III



Scoring clinical signs can help diagnosis of canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil
Clinical signs associated to canine leishmaniasis

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID:	MIOC-2016-0305
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	06-Jul-2016
Complete List of Authors:	Silva, Kléverton; Federal University of Piauí, Department of Community Medicine Mendonça, Vitor; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Silva, Kellen; Universidade Federal do Piauí Nascimento, Leopoldo; Universidade Federal do Piauí Mendes-Sousa, Antonio; Universidade Federal de Minas Gerais Pinho, Flaviane; Universidade Federal do Piauí Barral-Netto, Manoel; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Barral, Aldina; Instituto Gonçalo Moniz (IGM) - FIOCRUZ-BAHIA, Laboratorio de Imunoparasitologia Cruz, Maria do Socorro; Universidade Federal do Piauí,
Keyw ord:	canine visceral leishmaniasis, clinical score, diagnosis, clinical signs
Theme:	canine visceral leishmaniasis

SCHOLARONE™
Manuscripts

We are pleased to inform you that submission manuscript entitled "Scoring clinical signs can help diagnosis of canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil Clinical signs associated to canine leishmaniasis" received favorable comments from the Editors of the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

O estudo das variações clínicas de cães com LVC é bastante complicado, por se tratar de uma doença com um amplo espectro de apresentações clínicas. A suspeita clínica acaba sendo prejudicada por não existir um padrão de sinais que dê suporte para interpretações clínicas. Por essas dificuldades, nosso objetivo foi desenvolver uma ferramenta de avaliação clínica diagnóstico que possa auxiliar no diagnóstico, além de poder servir de base para o acompanhamento clínico de testes de terapias no combate à LVC.

Para isso, realizamos uma validação do escore clínico desenvolvido nos estudos citados anteriormente. Utilizamos resultados de avaliações clínicas e de testes sorológicos e parasitológicos para LVC de 443 cães da cidade de Teresina (PI).

7. CAPÍTULO III

Original Article

Running title

Clinical signs for diagnosis of CVL

Title

Scoring clinical signs can help diagnosis of canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil

K.R. Silva ^{1¶}, V.R. R. Mendonca ^{1¶}, K.M. Silva ², L.F.M. Nascimento², A.F. Mendes-Sousa ³, F. A. Pinho², M. Barral-Netto ^{1,4,5}, A. Barral ^{1,4,5}, M.S.P. Cruz ^{2*}

¹ *Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Brazil.*

² *Departamento de Morfofisiologia Veterinaria, Universidade Federal do Piaui, Campus Socopo, CEP 64049-550, Teresina, Brazil.*

³ *Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciencias Biologicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.*

⁴ *Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil.*

⁵ *Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, São Paulo, Brazil.*

¶ These authors equally contributed to the work

*Corresponding author: Tel: +55 (86) 3215-5748/5756

E-mail adress: mspcruz@gmail.com (M.S.P. Cruz).

Summary

Canine visceral leishmaniasis (CVL) diagnosis is still a challenge in endemic areas with limited resources for diagnostic techniques. Thus, this study proposes a score with potential to distinguish positive CVL cases from negative ill dogs. A total of 265 dogs were used and considered positive for CVL by ELISA and parasitological tests. A score ranging between 0-19 were recorded based on clinical signs. It is observed that dogs with CVL have overall a higher positivity of the majority of clinical signs than dogs negative to CVL or with ehrlichiosis. Clinical signs as enlarged lymph nodes (83.93%), muzzle/ear lesions (55.36%), nutritional status (51.79%), bristles condition (57.14%), pale (48.21%), onychogryphosis (58.93%), skin lesion (39.28%), bleeding (12.50%), muzzle depigmentation (41.07%), alopecia (39.29%), blepharitis (21.43%) and keratoconjunctivitis (42.86%) were more frequent in dogs with CVL compared with dogs with ehrlichiosis or CVL negative dogs. The clinical score was higher according to the positivity of all diagnostic tests (ELISA, $P < 0.001$; parasite culture, $P = 0.0021$; smear, $P = 0.0003$) when compared with negative dogs. Onychogryphosis (long nails) (OR: 3.529, 95% CI: 1.832-6.796, $P < 0.001$), muzzle depigmentation (OR: 4.651, 95% CI: 2.218-9.750, $P < 0.001$) and keratoconjunctivitis (OR: 5.400, 95% CI: 2.549-11.441, $P < 0.001$) were highly associated with CVL. Interestingly, a score cutoff value ≥ 6 had an area under the curve (AUC) of 0.717, $P < 0.0001$, sensitivity (60.71%) and specificity (73.64%) for diagnosis of CVL. The clinical sign-based score for CVL diagnosis suggested herein can help veterinarians in making a reliable identification of dogs with CVL in low-resource endemic areas.

Keywords: canine visceral leishmaniasis; clinical score; diagnosis; clinical signs.

Sponsorships: CAPES (COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR).

Introduction

American visceral leishmaniasis is a chronic parasitic zoonosis widespread in Latin America with 90% of the cases occurring in Brazil, where it affects more than 3,300 individuals per year (Alvar *et al.* 2012). It is caused by *Leishmania infantum* (syn *L. chagasi*) protozoan parasites and transmitted by the bite of infected female sand flies of the genus *Lutzomyia*. This disease affects mainly malnourished children under 10 years old and it is commonly fatal if not treated early (Alvar *et al.* 2012). In endemic urban areas, domestic dogs are important hosts of the parasite, acting as easy source of *Leishmania* infection for sand flies due to an intense cutaneous parasitism (Dantas-Torres 2007). In addition, Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is highly associated with cases of the human disease (De Araújo *et al.* 2013).

Infected dogs can present different clinical features ranging from apparently healthy (asymptomatic dogs) to several characteristic signs (symptomatic dogs) such as lymphadenopathy, onychogryphosis, cutaneous lesions, alopecia, apathy, vomiting, fever, diarrhea, polyuria, polydipsia, splenomegaly and pale mucous membranes (Mancianti *et al.* 1988). Many studies have shown that clinical signs of infected dogs are related to hematological and biochemical alterations as well as to antibody titers, parasite load and infectivity to the sand fly vector (Da Costa-Val *et al.* 2007; Manna *et al.* 2009; De Freitas *et al.* 2012; Foglia Manzillo *et al.* 2013; Ribeiro *et al.* 2013).

Diagnosis of CVL is a difficult task for veterinarians due to the facts that firstly, clinical signs are very variable and are similar to other pathologies as ehrlichiosis (Tafari *et al.*, 2001; de Castro *et al.*, 2004); secondly, histopathology is invasive, time-consuming and expensive, and thirdly, there it is not possible have a 100% specific and sensitive diagnostic test (Ferrer 1999). In endemic regions with limited resources, the diagnostic procedure is even worse since serology or molecular methods are difficult. In this context, a reliable clinical

score based on clinical signs is needed to help CVL diagnosis and management in endemic regions. In Italy, a severity score based on CVL signs was proposed, although it was not compared with CVL negative dogs to predict its diagnostic capacity (Manna *et al.* 2009).

A new scoring system based on frequently observed clinical signs is proposed in order to help a CVL diagnosis in regions with limited resources. In order to verify the efficacy of this clinical score, it was applied in a large sample of ill dogs (including CVL positive and negative animals), which were brought to care in a reference veterinarian hospital in a highly endemic low-resource area in Brazil.

Materials and Methods

Study design and dogs

All dogs that were brought for health care to the reference veterinary hospital of Federal University of Piauí (UFPI) in Teresina, a city in the northeast of Brazil, between 2011 and 2012 underwent a careful clinical examination by trained veterinarians. The owners of these dogs brought them when they usually had clinical signs and the veterinarians from communities and small villages suspected of CVL. Moreover, sick, stray dogs that were collected by the Zoonosis Control Center following the Brazilian Zoonosis Control Program were also included. These animals were recruited because they were homeless dogs, and many of them were sick. The veterinarian hospital from the UFPI is a reference for CVL in the region, and all dogs that have clinical signs similar to leishmaniasis underwent routinely clinical and laboratorial tests for this pathology.

Fourteen different signs were evaluated in the dogs by observing the presence of signs attributable to *Leishmania* infection using the following criteria:

Systemic signs;

- Attitude: active (0), apathetic (1);
- Ectoparasites: absence (0), fleas (1), fleas and ticks (2);

- Nutritional status: normal (0), thin (1), cachectic (2);
- Lymph nodes: normal (0), enlarged (1);
- Mucosal color: normal (0), pale (1);
- Bleeding: absence (0), presence (1);

Cutaneous signs;

- Bristles: good (0), regular (1), bad/opaque (2);
- Muzzle/ear lesion: absence (0), presence (1);
- Nails: normal (0), long/onychogryphosis (1);
- Skin lesion: absence (0), presence (1), ulcer (2);
- Muzzle depigmentation: absence (0), presence (1);
- Alopecia: absence (0), presence (1);

Ocular signs;

- Blepharitis: absence (0), presence (1);
- Keratoconjunctivitis: absence (0), serous (1), mucopurulent (2).

The clinical assessment was performed by three veterinarians who scored signs according to criteria above described. In addition, all the individual scores produced a total sign-based score ranging between 0-19 adapted by Manna *et al* (2009).

A total of 443 mixed-breed adult male and female dogs of different ages (from 6 months to 13 years) and breeds naturally infected dogs with VL were studied. The remaining dogs (sick dogs) were considered positive for VL following positive in serological test and positive at least one parasitological test (CVL positive). Dogs considered negative for VL were those with all three diagnostic tests negative (CVL negative). CVL positive dogs and co-infected with *Ehrlichia canis* and/or *Babesia canis* were excluded from this study. In addition, a group of dogs infected by *E. canis* (and negative for CVL, n=22) underwent clinical exam (based on the proposed score) and was included in this study.

Diagnostic tests

Blood was obtained by jugular venopuncture and samples of bone marrow obtained by sternal puncture and lymph node aspiration (both tests for all dogs). Scrapings of skin lesions suggestive of CVL were also collected. The smears from these tissues were prepared and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich) stain and examined microscopically with a 100X objective for the presence of amastigotes. Bone marrow and lymph node aspirate was transferred to NNN-Schneider's culture medium (Sigma-Aldrich), which was maintained at 25 °C and examined weekly for 30 days. Soluble *Leishmania* antigen (SLA) was obtained from *Leishmania* spp. cultivation using 1×10^{10} promastigotes (Souza *et al.* 2013) to detection of IgG anti-*Leishmania* antibodies by ELISA (Badaro *et al.* 1986). The serum titration used was 1:400 and the cutoff was calculated for each plate by the mean of three negative serum ± 2 standard deviations. Diagnostic canine VL tests including ELISA, parasite culture or smear were performed for all dogs. Dogs were considered positive for VL following positive ELISA (high sensitive method) and positive parasite culture or smear (high specific method). Dogs considered negative for VL were those with all three diagnostic tests negative.

Ehrlichia canis and *Babesia canis* infections were diagnosed through nested PCR and PCR, respectively, by the protocols routinely used in the Animal Pathology Laboratory of the UFPI using DNA from peripheral blood (Wen *et al.* 1997; Jefferies *et al.* 2007). Detection of *E. canis* was based on the 16S rRNA gene and *B. canis* by 18S rRNA gene.

Ethics Statement

This study was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Piauí with the protocol number 021/12. In addition, the animal care in this manuscript was

under the guidelines regulated by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Data analysis

In the exploratory analysis of the data, frequency tables were constructed and the Chi-square or Fisher's exact tests were applied to evaluate the association between qualitative variables (gender and breed). Clinical signs severity was treated as ordinal variables. The quantitative variables (total score and score based on statistically different signs) were tested for Gaussian distribution within the total sample using D'Agostino and Pearson's omnibus normality test. No variables were found to be normally distributed ($P < 0.0001$ for all of them, thus didn't pass normality test) and non-parametric tests were therefore used. In this context, the Mann-Whitney test was used to assess the differences between two groups. Heat maps and hierarchical cluster analyses using Ward's method were performed in order to better understand the association of signs in all sick dogs and according to CVL status. Univariate logistic regression analysis was performed to test associations between presence or absence of each clinical sign and clinical score cutoff values with CVL positivity. Receiver operator characteristic (ROC) curves with C-statistics were used to establish the threshold value of clinical scores able to discriminate between positive and negative CVL.

In order to understand how the signs associate with each other, network analyses based on clinical signs and represented by statistically significant correlations were done for all sick and CVL positive dogs. Correlations between all quantitative variables were done by the Spearman test using the JMP 11.0 software (SAS, Cary, NC, USA) and correlations were used to build the networks represented by the association between signs. The links between signs represent only the statistically significant correlations ($P < 0.05$). The complexity of the networks was estimated from the density of interactions of each network, which can be measured by: density (D) = $L / (N(N-1) / 2)$, in which L is the number of observed edges (i.e.,

Spearman correlations with $P < 0.05$) and N is the total number of the nodes in the network, and the density can range between 0 (no edges in the network) and 1 (all possible edges present). Network figures were customized using the Ingenuity Systems Pathway Analysis software (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) and Adobe Illustrator (Adobe Systems Inc.). The statistical analyses were performed using the programs GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., USA), SPSS 22.0 (IBM, USA), and JMP 11.0 (SAS, Cary, NC, USA). A P value lower than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Baseline characteristics

A total of 443 dogs screened, 178 animals were co-infected with *L. infantum* and *Ehrlichia canis* or *Babesia canis* being excluded from this study ($n=120$ and 58 , respectively). A total of 265 sick dogs with no preferences regarding gender and breed were recruited, 89 (33.58%) dogs were originally from the veterinary hospital and 176 (66.42%) from the Brazilian Zoonosis Control Program. The frequency of male and female animals was very similar (47.55% for males, Table 1). No differences were seen in dog gender or breed relative to positive or negative CVL ($P = 1.000$ and $P = 0.539$, respectively). Reproductive status was unrecorded in this study. The distribution of breeds among all sick dogs and according to VL status is described in detail in Table 1.

The frequency of all the clinical signs recorded in the score in the different study groups (CVL positive, CVL negative, *E. canis* infected dogs) are described in Table 2. As expected, it is observed that dogs with CVL have overall a higher positivity of the majority of clinical signs than dogs negative to CVL or with ehrlichiosis (Table 2). Clinical signs as enlarged lymph nodes ($P < 0.0001$), muzzle/ear lesions ($P < 0.0001$), nutritional status ($P < 0.0001$), bristles condition ($P = 0.0001$), pale ($P = 0.0202$), onychogryphosis ($P < 0.0001$), muzzle depigmentation ($P = 0.0002$), alopecia ($P = 0.0129$), blepharitis ($P = 0.0159$) and

keratoconjunctivitis ($P = 0.0009$) were more frequent in dogs with CVL compared with dogs with ehrlichiosis (Table 2). To confirm if these clinical signs are more important in CVL cases, it also was compared ill dogs negative for CVL and *E. canis* infected subjects. Thus, it was seen that dogs with ehrlichiosis have less enlarged lymph nodes ($P < 0.0001$), less muzzle/ear lesions ($P = 0.0022$), less onychogryphosis ($P = 0.0274$) and better nutritional status ($P = 0.0274$) and bristles condition ($P = 0.0035$) (Table 2).

Diagnostic tests and dog clinical signs

ELISA, cultures, and smears were performed in all dogs. The positivity for each and the association of tests are described in Figure 1A. In the total of 265 dogs, 129 (48.68%) were negative for all tests and were considered negative for CVL. Fifty-six dogs (21.13%) had positive ELISA and positive parasite culture ($n=46$) or/and positive parasite smear ($n=35$) and were considered positive for CVL (Figure 1A). The next objective was to know if the total score value (range 0-19), which combines all the signs, differs according to the results of the diagnostic tests (Figure 1B). It was demonstrated that the sign-based score was higher according to positivity for all three diagnostic tests (ELISA $P < 0.001$; parasite culture $P = 0.0021$; smear $P = 0.0003$) and their combined results (ELISA and parasite culture $P < 0.0001$; ELISA and parasite smear $P < 0.0001$) when compared with the negativity of these tests (Figure 1B).

A heat map analysis was performed with the identification of clusters based on signs of sick dogs (Figure 2). Overall, it was observed that presence of some signs is more frequently found in sick dogs for CVL, as illustrated by lymph node enlargement, presence of ectoparasites, alterations in the bristles and muzzle/ear lesions (Figure 2). In addition, organ-related signs from the proposed score (systemic, cutaneous and ocular groups) have a general trend to be clustered. Clusters were observed between ocular signs (keratoconjunctivitis and

blepharitis) and between cutaneous signs (skin lesion and muzzle/ear lesion, for example) demonstrating that these signs are associated in sick dogs from this endemic area (Figure 2).

Networking the clinical signs according to CVL status

A higher complexity, measured by the network density ($D=0.346$), was observed in all dogs when compared with CVL positive dogs ($D=0.165$) (Figures 3A and 3C, respectively); however, it could be due to different sample sizes. The majority of signs (except lymph node and ectoparasites) had a high level of association in all dogs brought into the reference veterinary hospital for health care (Figure 3A). The percentage of positivity for each sign for all dogs is represented by Figure 3B. Regarding the CVL positive dogs, half of the total signs (keratoconjunctivitis, mucosal color, muzzle depigmentation, nutritional status, nails, bristles, blepharitis) had the highest number of connections, suggesting an important role for them for the final clinical profile, and the only significant negative correlation was between lymph node and nutritional status variables (Figure 3C). Furthermore, the percentage of positivity for each sign in the CVL positive dogs is demonstrated in Figure 3D. The results show that overall clinical sign positivity is slightly more expressed in CVL positive dogs compared to all sick dogs and the relative distributions of some signs are different between the two groups, as illustrated by serous or mucopurulent keratoconjunctivitis (42.86% and 20.65%, $p=0.001$, Figures 3D and 3B, respectively).

Heat map analyses according to the different signs were performed for CVL negative and positive dogs (Figures 4A and 4B, respectively). Results showed that the majority of signs are expressed more highly in CVL positive than negative dogs. Moreover, the signs with the highest connectivity demonstrated in Figure 3C also clustered in the CVL positive heat map (highlighted in Figure 4B) with smaller clusters between the following pairs of signs: mucosal color and muzzle depigmentation; nutritional status and nails; bristles and blepharitis (Figure 4B).

Association between clinical profile and CVL

Ten of the total 14 signs seem to favor CVL with special influence of onychogryphosis (long nails) (OR: 3.529, 95%CI: 1.832-6.796, $P < 0.001$), muzzle depigmentation (OR: 4.651, 95%CI: 2.218-9.750, $P < 0.001$) and keratoconjunctivitis (OR: 5.400, 95% CI: 2.549-11.441, $P < 0.001$) (Figure 5A). Apathy (attitude), presence of ectoparasites, pale mucosal color and lymph node enlargement did not show influence on CVL ($P = 0.433$, $P = 0.609$, $P = 0.097$ and 0.068 , respectively; Figure 5A). Cutoff values (≥ 6 , ≥ 9 and ≥ 12) for the total clinical score (range 0-19) established by ROC curve and C statistics analyses in Figure 5B also were imputed in the regression model. It was observed that the cutoffs ≥ 6 (OR: 4.151, 95%CI: 2.141-8.047, $P < 0.001$) and ≥ 9 (OR: 5.812, 95%CI: 2.399-14.083, $P < 0.001$) had about the same performance in distinguishing between CVL positive and negative animals and a cutoff value ≥ 12 had a lower precision (with a higher CI) than the other described cutoffs (OR: 5.040, 95%CI: 1.213-20.20937, $P = 0.026$) (Figure 5A).

Total clinical score (14 signs, range 0-19) and a score based on statistically different signs is shown in Figure 5A (10 signs, range 0-14) had considerable power to distinguish between positive and negative CVL dogs (Figure 5B). The total score had an area under the curve (AUC) of 0.717, $P < 0.0001$ and a cutoff value of ≥ 6 was the one with the best sensitivity for association (60.71%) and specificity (73.64%) to discriminate CVL (Figure 5B). With higher cutoff values ≥ 9 and ≥ 12 the specificity increased (93.02% and 97.67%, respectively) despite the decrease in sensitivity (30.36% and 10.71%, respectively). Furthermore, the score based on statistically different signs had an AUC of 0.727, $P < 0.0001$ and a ≥ 3 cutoff_value had sensitivity and specificity of 73.21% and 62.02% (respectively) to discriminate animals according to visceral leishmaniasis status (Figure 5B).

The proposed score herein was applied in dogs infected with ehrlichiosis (and negative for CVL) in order to assess the ability of this score to test the specificity to CVL diagnosis.

The clinical signs observed in the subjects infected by *E. canis* are described in the Table 2. With a cutoff value ≥ 3 , the total score had an AUC of 0.9391, $P < 0.0001$, sensitivity and specificity of 85.71% and 86.36%, respectively, to distinguish CVL positive dogs from those with ehrlichiosis.

Discussion

In low-resources endemic areas, serological and molecular diagnostic methods for CVL may be unavailable and diagnosis suspect based on only clinical signs is sometimes necessary. In the present report, dogs positive for CVL by different diagnostic methods (ELISA, parasite smear or culture) have a higher clinical score than CVL negative ill dogs. Cutoff value ≥ 6 obtained from the clinical score proposed herein performed well in distinguishing CVL positive dogs from negative sick dogs with 60.71% and 73.64% of sensitivity and specificity, respectively. Opposite to clinical model proposed by Gouvea *et al* (2016) who demonstrated a cutoff of ≥ 2 . They have showed that a cutoff ≥ 9 including clinical score and serology test (IFAT) is the best to detect the most infectious dogs and its model could be used to disease control.

Clinical signs of CVL are important for canine diagnosis, and the clinical score based on sick dogs' signs proposed herein was higher in subjects positive for CVL by different diagnostic tests, suggesting it can help in diagnostic depending on cutoff values chosen. A group of clinical signs of *Leishmania* infection (keratoconjunctivitis, mucosal color, muzzle depigmentation, nutritional status, nails, bristles and blepharitis) was highly associated and also clustered in the heat map results. Furthermore, the sole presence of onychogryphosis, muzzle depigmentation or keratoconjunctivitis correlated highly with leishmaniasis infection. Manna *et al.* (2009) also created a severity clinical score which was associated with parasite load in canine visceral leishmaniasis; however, this severity score was not compared with sick dogs without CVL to establish its diagnostic power. Another studies have been demonstrated

a model based on a scoring system combining clinical signs and serological (IFAT) results as tool to help in the VL control strategies (Proverbio *et al.*, 2014; Gouvêa *et al.*, 2016).

Canine visceral leishmaniasis diagnosis is still a challenge for veterinarians as there is no perfect diagnostic test for this condition (Solano-Gallego *et al.*, 2011). In the present study, CVL dogs were diagnosed by both a positive serological test (ELISA) and a positive parasitological test (parasite culture or smear) to confirm CVL diagnosis by high sensitivity and specificity methods, respectively. CVL diagnoses based only on anti-*Leishmania* antibody detection are not satisfactory as they do not discriminate between disease and asymptomatic condition, and also cross-react with other pathogens (Sarkari *et al.*, 2005; Zanette *et al.*, 2014). For example, conventional serological methods using crude antigen to detect antibodies against *Leishmania* spp also observed cross-reactivity with *Trypanosoma cruzi* because both parasites share antigenic epitope due to the phylogenetic similarity between them (Zanette *et al.*, 2014). Moreover, it was not yet detected infected dogs with *T. cruzi* in Teresina, PI. These aspect may contribute to different sensibility and specificity results obtained in the serological methods (Arruda *et al.*, 2016).

In both sick and CVL positive dogs, lymph node enlargement was the most common sign. In several case series, lymphadenomegaly was the most frequent clinical sign in dogs with visceral leishmaniasis (Ciaramella *et al.* 1997; Moreno and Alvar, 2002; Amusategui *et al.* 2003; Manna *et al.* 2009). However, lymph node enlargement is a frequent response to infectious agents and it is not specific for visceral leishmaniasis (Mylonakis *et al.* 2011; Rodríguez-Morales *et al.* 2011; Salem and Farag, 2014).

Keratoconjunctivitis and ocular signs in general are commonly observed in several case series with similar frequencies (Ferrer, 1999; Amusategui *et al.* 2003; Manna *et al.* 2009; De Freitas *et al.* 2012; Foglia Manzillo *et al.* 2013). In the present report, 42.86% and 21.82% of dogs with CVL had keratoconjunctivitis and blepharitis, respectively. Intriguingly, the

clinical spectrum of CVL may be diverse depending on the phase of the disease, the state of the dog's immunity and previous specific therapies; thus, these features need to be considered for CVL diagnosis (Ciaramella *et al.* 1997; Foglia Manzillo *et al.* 2013).

In the network analysis, it was observed that some clinical signs (keratoconjunctivitis, mucosal color, muzzle depigmentation, nutritional status, nails, bristles and blepharitis) were associated more than other signs in CVL positive dogs. Moreover, these signs were also clustered in the heat map analysis, indicating an important role in predicting visceral leishmaniasis status. Ocular signs (i.e. blepharitis and keratoconjunctivitis), cutaneous signs (i.e. onychogryphosis and opaque bristles), systemic signs (i.e. pale mucous membrane and weight loss) have been extensively described in CVL clinical studies (Ciaramella *et al.* 1997; Amusatogui *et al.* 2003; Manna *et al.* 2009; De Freitas *et al.* 2012; Foglia Manzillo *et al.* 2013). Cutaneous findings are very common in dogs with CVL and the presence of skin lesions (including ulcers), onychogryphosis, alterations in the bristles, dermatitis and alopecia should be carefully considered in sick dogs from endemic areas (Ciaramella *et al.* 1997; Ferrer, 1999).

Among the 14 different clinical signs that comprise the clinical score in this study, many of them were able to differentiate CVL positive from other sick dogs, and a special role was observed for the presence of keratoconjunctivitis, onychogryphosis and muzzle depigmentation in the dogs with visceral leishmaniasis. In the Mancianti *et al.* (1988) classification of CVL dogs into asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic cases, the presence of onychogryphosis, keratoconjunctivitis and cutaneous alterations are clinical signs expected in symptomatic dogs. Interestingly, chronic cutaneous changes and ocular lesions were also signs that characterized dogs with severe CVL (Ciaramella *et al.* 1997). In addition, cutoff values for the clinical score proposed herein performed well (AUCs higher than 70%) distinguishing CVL positive dogs from other sick dogs (with different diseases). Higher

cutoff values had a better specificity for CVL diagnosis since dogs with elevated clinical score had more signs of this disease; although high cut-offs lacked sensitivity, they could be used with good reliability for CVL confirmation in severely sick dogs in endemic areas.

In this study, 17 dogs had positive smear and/or culture and negative ELISA for CVL (Figure 1A). Noteworthy, when compared the clinical score in the subjects with CVL positivity (based on this study criteria) and those with only positive smear and/or culture, it was found that these dogs had a lower score ($P = 0.0057$). Probably, these subjects may be in the beginning of the infection and have not a clinical response to leishmaniasis yet.

In this study CVL dogs co-infected by *Ehrlichia canis* and *Babesia canis*, which can produce similar clinical findings to CVL were excluded (Ciaramella *et al.* 1997). Some studies have demonstrated that coinfection cases presented more severity of clinical-pathological abnormalities and misdiagnosis is frequent in routine of veterinary practices (Andrade *et al.*, 2014). Thus, we have applied our clinical model only in monoinfected dogs with VL and ehrlichiosis. The clinical score when applied in dogs infected with *E. canis* it was observed a great discriminatory power to distinguish CVL dogs from ehrlichiosis, suggesting the ability of this score to detect CVL when *E. canis* was not previously excluded. Other diseases requiring potential differential diagnosis for CVL were present in the present study. Dogs with trypanosomiasis caused by *Trypanosoma cruzi* have a general lymphadenopathy (Barr *et al.* 1991), which is an usual clinical sign found in all dogs from this study. Furthermore, severe seborrhea as well as focal or diffuse alopecia, pustules and blemishes are frequently observed in 12 to 23% of atopic dogs (canine atopic dermatitis) and could also be found in the sick dogs negative for CVL described herein (Hensel *et al.* 2015). Similarly, bacterial skin diseases, superficial and deep folliculitis, and keratinization disorders may also be confused with clinical signs of visceral leishmaniasis and need to be considered in the negative CVL dogs (Cardoso *et al.* 2011).

In the present study, a clinical sign-based score for CVL diagnosis is described that can help veterinarians in making a reliable identification of dogs with visceral leishmaniasis. Even though there is no evidence supporting dog culling for visceral leishmaniasis control, this practice is still done in many endemic areas; thus, a correct diagnosis is fundamental for this important decision (Costa 2011). The clinical score proposed herein is a guide for veterinarians mainly from low-resources and highly endemic areas, who do not have diagnostic tests available. Moreover, this clinical score can help confirming some diagnostic test results (i.e. serological methods). Nevertheless, diagnostic tests are still the best way to confirm CVL in sick dogs and should not be totally replaced by diagnosis based only on clinical signs.

Appropriate CVL diagnosis is a big challenge in endemic areas with limited resources. We report here that a score based on clinical signs of sick dogs in a highly endemic region can help CVL diagnosis. Overall, the clinical score proposed had a good performance in discriminating positive CVL dogs from other sick dogs. Furthermore, some clinical signs were more correlated with CVL positivity, particularly ocular and cutaneous signs. Results found in this study may help veterinarians to make correct CVL diagnosis of sick dogs; however, further studies with larger samples are needed in order to confirm and validate this clinical score because in this work only dogs examined in the veterinary hospital or Zoonosis Control Center were studied where it has higher prevalence of CVL which can influence in the positive predictive values of the diagnostic tests.

Acknowledgments

The authors thank all employees from the veterinary hospital of Federal University of Piauí, Teresina, Brazil. The authors also thank our team at FIOCRUZ-Bahia, Brazil, Jorge Tolentino, Adorielze Leite, Nataly Alexandrino and Andrezza Kariny for help with logistics, and Global Science Editing, UK for English language corrections.

References

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 2012; 7(5): e35671.
- Andrade GB, Barreto WT, Santos LL, Ribeiro LR, Macedo GC, Sousa KC, Andre MR, Machado RZ, Herrera HM. Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Rev Bras Parasitol Vet*, 2014, 23, 509-515.
- Amusatogui I, Sainz A, Rodriguez F, Tesouro MA. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol*, 2003; 18(2): 147-156.
- Arruda MM, Figueiredo FB, Marcelino AP, Barbosa JR, Werneck GL, Noronha EF, *et al.* Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine *Leishmania* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(3):168-73.
- Badaro R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg*, 1986; 35(1): 72-8.
- Barr SC, Gossett KA, Klei TR. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observations of trypanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. *Am J Vet Res*, 1991; 52(6): 954-60.
- Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, 1997; 141(21): 539-43.
- Costa CH. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2011; 44(2): 232-42.

- da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Michalik MS, Alexander B, Williams P, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J*, 2007; 174(3): 636-43.
- Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol*, 2007; 149(3-4): 139-46.
- De Araújo VEM, Pinheiro LC, Almeida MCM, Menezes FC, Morais, MHF, Reis IA, *et al.* Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: A spatial analysis in urban area. Kamhawi S, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(11):e2540.
- De Castro MB, Machado RZ, de Aquino LP, Alessi AC, Costa MT. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol*, 2004;119(1):73-86.
- De Freitas JC, Lopes-Neto BE, de Abreu CR, Coura-Vital W, Braga SL, Reis AB, *et al.* Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, 2012; 93(2): 705-9.
- Ferrer L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In *Canine Leishmaniasis An Update Proc Int Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain; 1999:6-10.*
- Foglia Manzillo V, Muccio TD, Capiello S, Scalone A, Paparcone R, Fiorentino E, *et al.* Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. In: OZCEL, M. A. (Ed.). *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(5):e2225.

- Gouvêa MV, Mendonça IL, Cruz MSP, Costa CHN, Braga JU, Werneck GL. Predictive factors for *Leishmania infantum* infection in dogs examined at a veterinary teaching hospital in Teresina, State of Piauí, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2016; 49(1): 107-111.
- Hensel P, Santoro D, Favrot C, Hill P, Griffin C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res*, 2015;11:196.
- Jefferies R, Ryan UM, Irwin PJ. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Vet Parasitol*, 2007; 144(1-2): 20-7.
- Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1988; 82(4).
- Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci*, 2009; 87(1).
- Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, 2002; 18(9).
- Mylonakis ME, Borjesson DL, Leontides L, Siarkou VI, Theodorou K, Koutinas AF. Cytologic patterns of lymphadenopathy in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Clin Pathol*, 2011; 40(1): 78-83.
- 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 Res. Int.* 2014;2014:412808.
- Ribeiro RR, da Silva SM, Fulgêncio Gde O, Michalick MS, Frezard FJ. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet*, 2013; 22(3): 373-8.

Rodríguez-Morales O, Ballinas-Verdugo MA, Alexandre-Aguilar R, Reyes PA, Arce-Fonseca M. *Trypanosoma cruzi* congenital transmission in dogs with Chagas disease: experimental case report. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011; 11(10): 1365-70.

Salem NY, Farag HS. Clinical, hematologic and molecular findings in naturally occurring *Babesia canis vogeli* in Egyptian dogs. *Vet Med Int*, 2014; ID 270345.

Sarkari B, Michael C, Hommel M. A capture ELISA for the diagnosis of visceral leishmaniasis using a monoclonal antibody against a leishmanial urinary antigen. *Iran Biomed J*, 2005; 9:117–122.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2011; 4:86.

Souza AP, Soto M, Costa JML, Boaventura VS, Oliveira CI, Cristal JR *et al.* Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *PLoS One*, 2013; 8(6): e66110.

Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*, 2001; 96(3):203-12.

Zanette MF, Lima VF, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RFC, *et al.* Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2014; 47:105-107.

Wen B, Rikihisa Y, Mott JM, Greene R, Kim HY, Zhi N, *et al.* Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol*, 1997; 35(7): 1852-5.

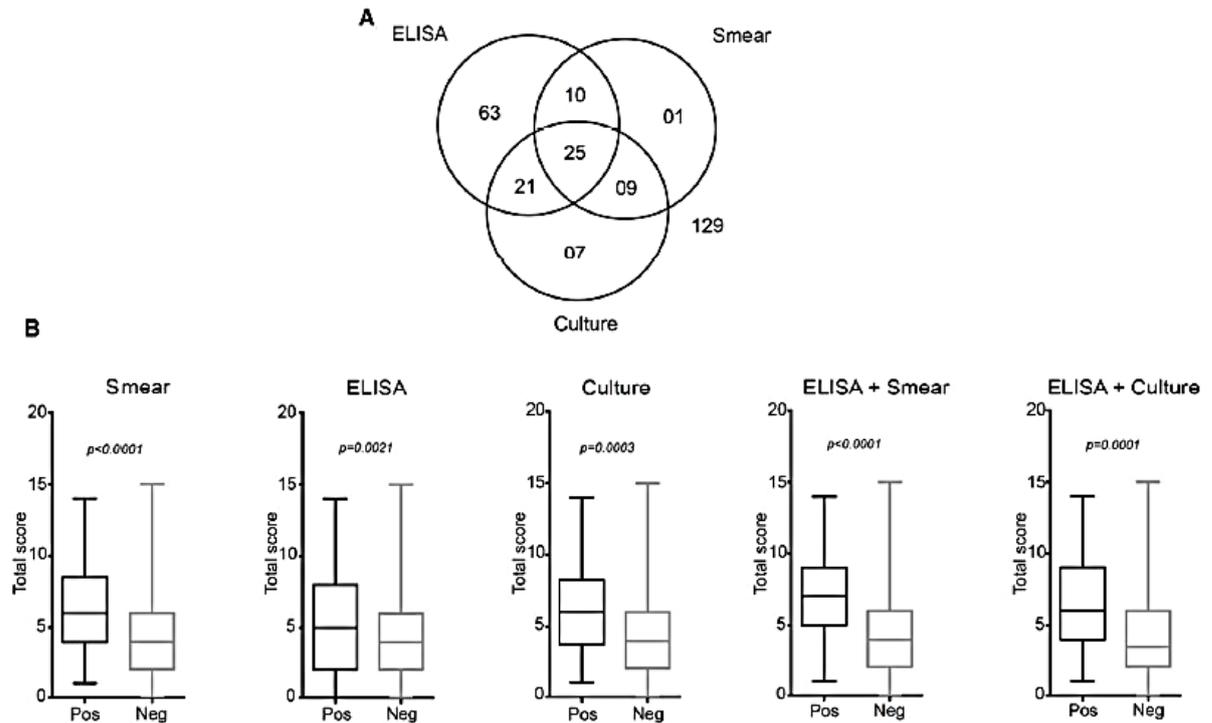


Figure 1. Canine Visceral Leishmaniasis diagnostic tests and clinical signs. ELISA, smear and culture for CVL were performed for all dogs brought for health care to a reference veterinary hospital in the endemic area (A). Total signs score (range 0-19) were higher in subjects with positive ELISA, culture, slide and for the combinations of ELISA+culture or ELISA+slide (B). Data were compared using the Mann Whitney test (B).

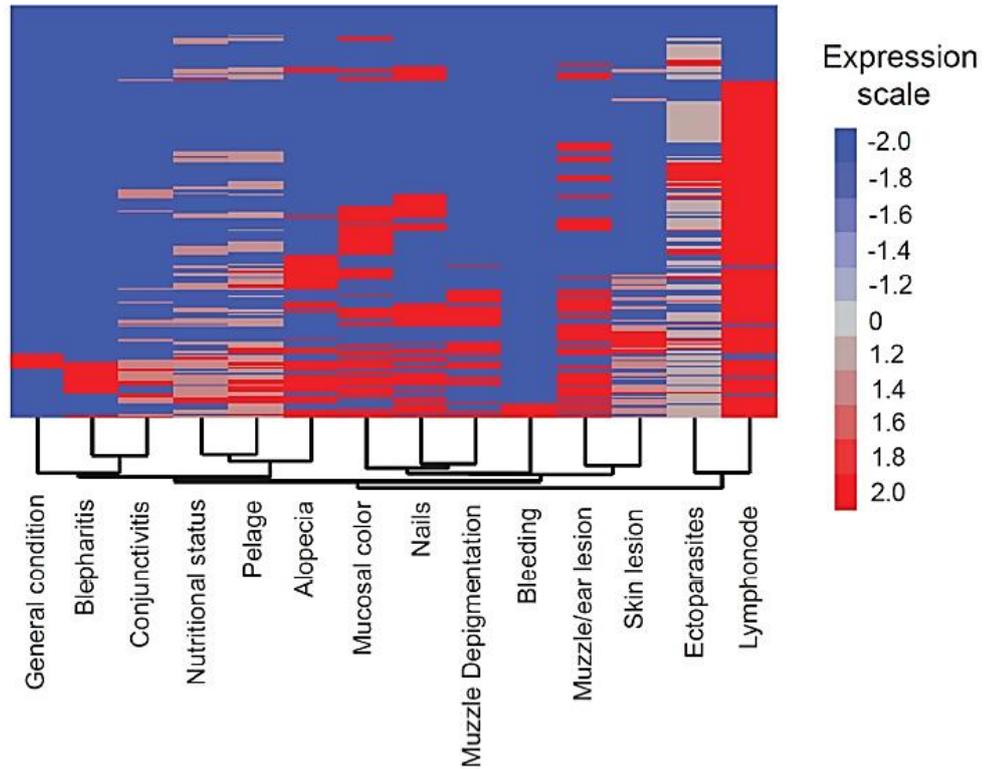


Figure 2. Heat map analysis of all sick dogs. Fourteen different signs were evaluated according to the proposed clinical score, and a two-way hierarchical cluster analysis (Ward's method) was done to look for patterns of associations between different signs for all dogs. The colors show the fold variation from the median values (log transformed) calculated for each sign as represented by the expression scale.

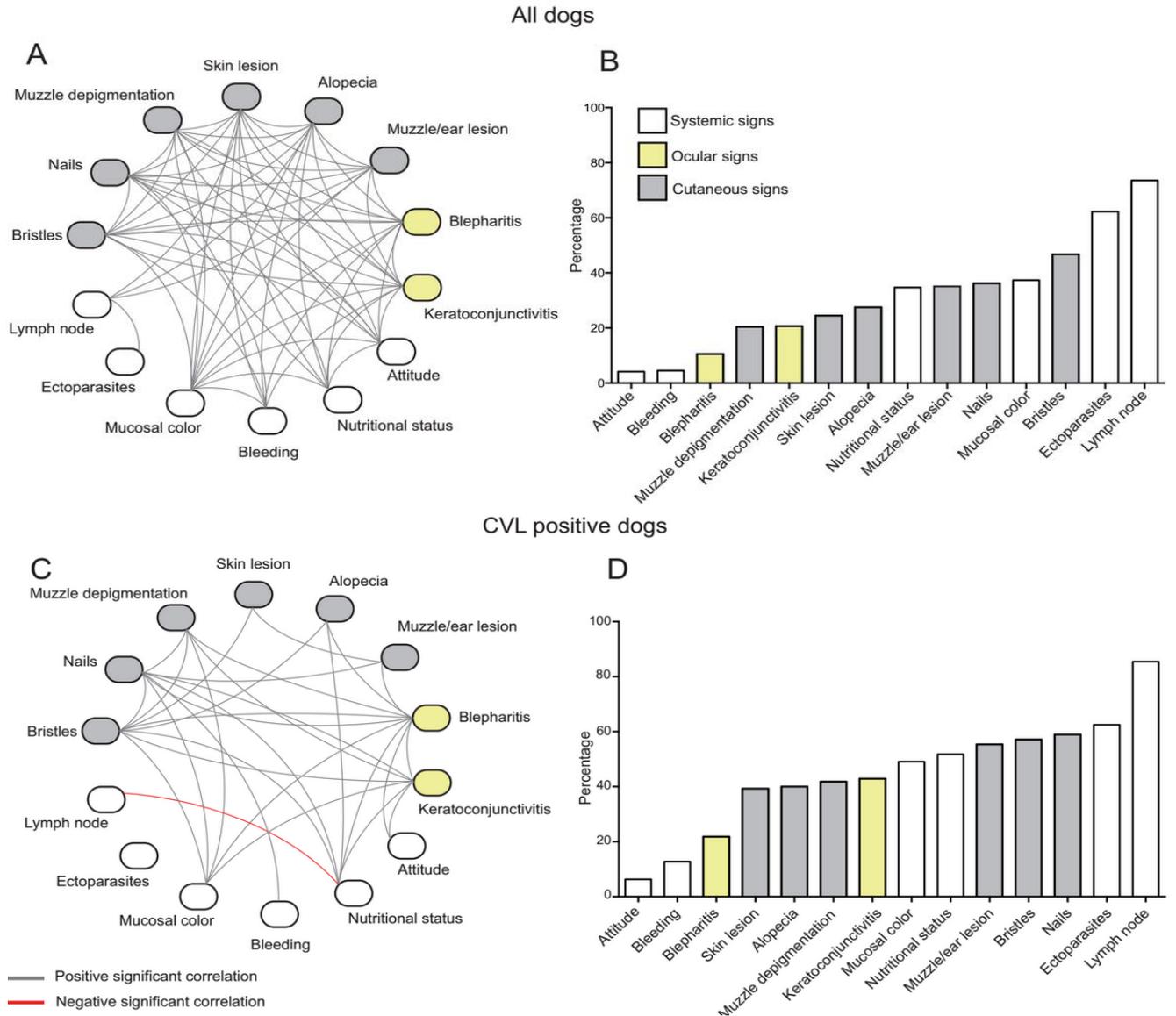


Figure 3. Networking the clinical signs of dogs with visceral leishmaniasis. The network analysis (interactome) shows statistically significant correlations ($P < 0.05$) between all the signs recorded for all sick dogs (A) and dogs positive for CVL (C). Data were analyzed using Spearman rank tests. Yellow colored items are ocular signs, grey icons are skin/appendage signs and white entries are systemic signs. Grey and red lines represent positive and negative significant correlations, respectively. The percentages of positivity for each sign are illustrated for all dogs (B) and CVL positive dogs (D).

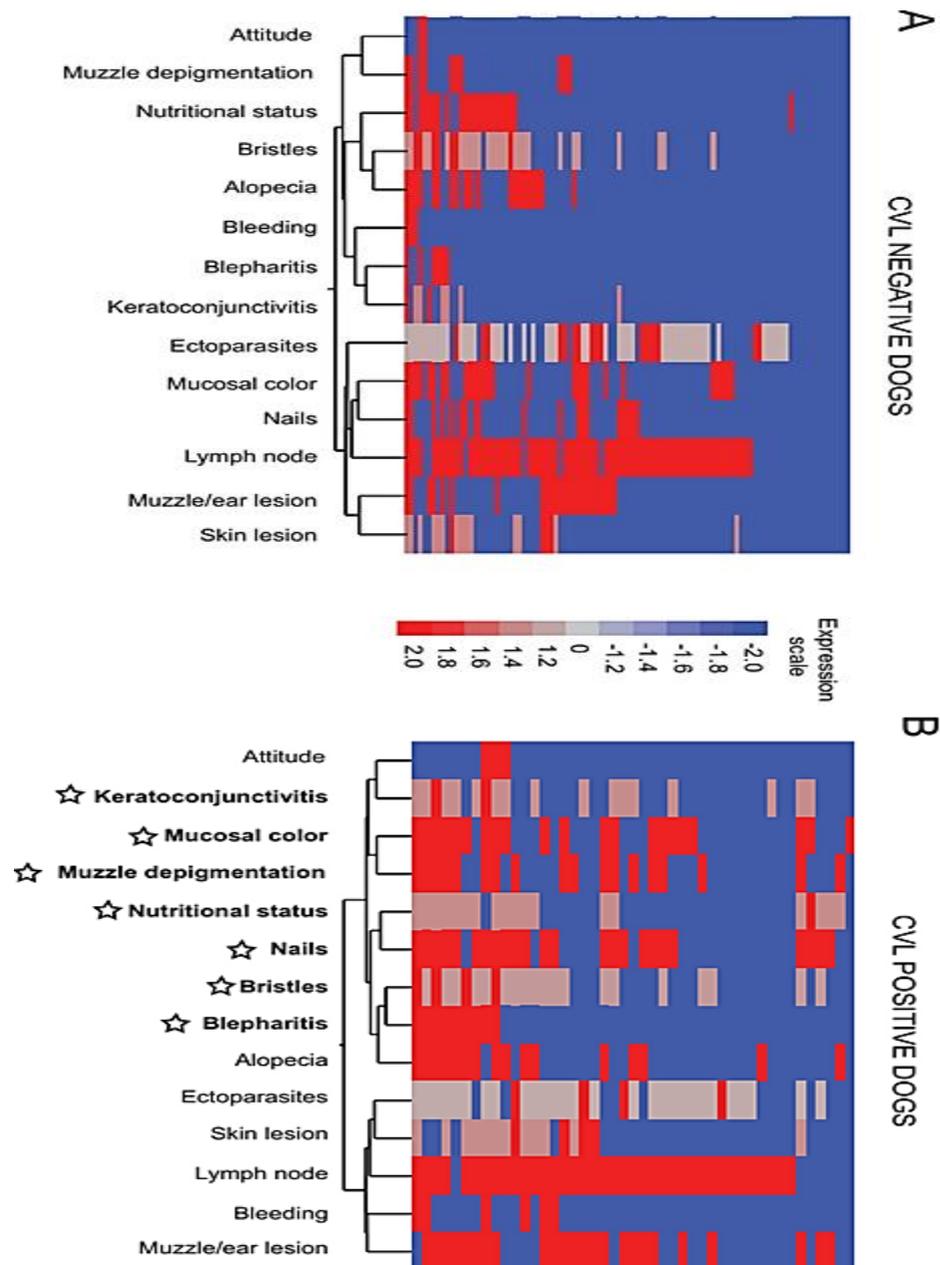


Figure 4. Heat map analysis of dog clinical signs according to CVL 33 status. Two-way hierarchical cluster analysis (Ward's method) was done to look for patterns of associations between different signs for CVL negative dogs (A) and CVL positive dogs (B). The colors show the fold variation from the median values (log transformed) calculated for each sign. Highlighted in bold and with star symbols are those signs with highest association observed in CVL positive dogs in Figure 3C.

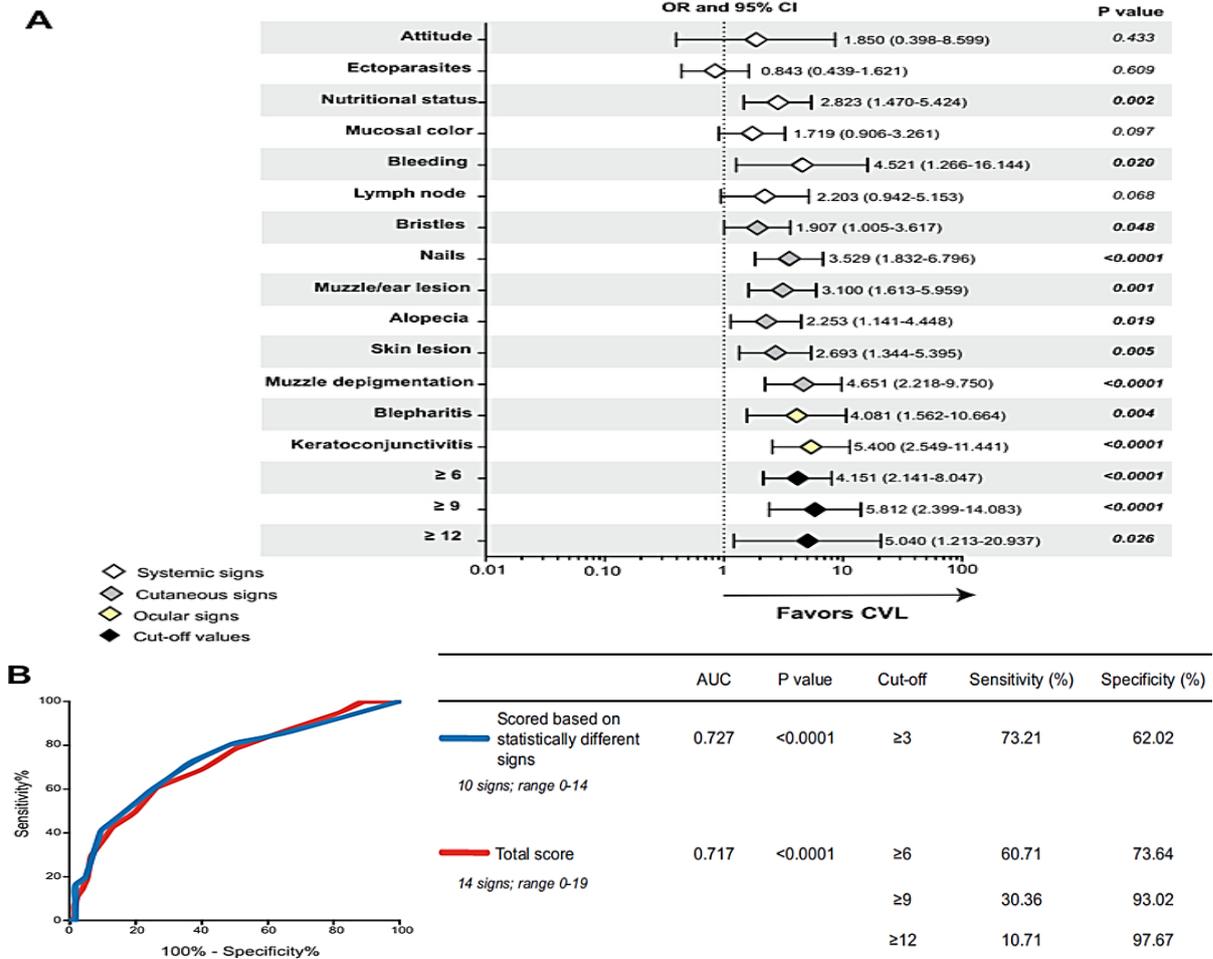


Figure 5. Association of clinical signs and clinical scores with CVL. Univariate logistic regression analyses were done to estimate the association of each sign (based on median values or cut-off values (≥ 6 , ≥ 9 and ≥ 12) with Canine Visceral Leishmaniasis (A). Yellow colored items are ocular signs, grey icons are skin/appendage signs, white items are systemic signs and black ones represents random cut-off values for the total clinical score (range 0-19). ROC curves of the total score (red line) and the score based on statistically significant different signs (based on A analysis, blue line) for discriminating between dogs with and without visceral leishmaniasis are shown in B. AUC, area under the curve. The cut-off values for the scores were established by C statistics and are shown in the table (B). The odds ratios (OR), respective 95% confidence intervals (95% CIs), and P values are shown in each panel.

Tables

Table 1. Baseline characteristics of sick dogs recruited in this study.

	CVL positive n=56	CVL negative n=129	All dogs n=265	P value*
Male n(%)	26 (46.43)	60 (46.51)	126 (47.55)	1.000**
Breed n(%)				
Dalmatian	0 (0.00)	1 (0.77)	2 (0.75)	
Brazilian mastiff	0 (0.00)	1 (0.77)	3 (1.13)	
German Shepherd	1 (1.79)	2 (1.55)	5 (1.89)	
Pinscher	2 (3.57)	3 (2.33)	7 (2.64)	
Pit bull	2 (3.57)	4 (3.10)	9 (3.40)	
Poodle	2 (3.57)	9 (6.98)	14 (5.28)	0.539***
Rottweiler	1 (1.79)	3 (2.33)	5 (1.89)	
Yorkshire	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (0.75)	
Mongrel	46 (82.14)	94 (72.87)	201 (75.85)	
Others	2 (3.57)	12 (9.30)	17 (6.42)	

*P value was calculated comparing VL positive and negative subjects. **Fisher's exact test was used. ***Chi-square test was used and breeds with less than 2 dogs for each group were not included

Table 2. Frequency of clinical signs in dogs with visceral leishmaniasis, ehrlichiosis and without CVL.

Clinical signs n(%)	1 VL positive n=56	2 VL negative n=129	3 <i>E. canis</i> n=22	P value 1 vs. 2	P value vs. 3	1	P value 2 vs. 3
Apathy*	3 (5.36)	4 (3.10)	1 (4.54)	0.4341	1.000		0.5502
Nutritional status**							
Thin	26 (46.43)	35 (27.13)	1 (4.54)	0.0023	<0.0001		0.0274
Cachectic	3 (5.36)	0 (0.00)	0 (0.00)				
Enlarged lymph nodes*	47 (83.93)	88 (68.22)	5 (22.73)	0.0308	<0.0001		<0.0001
Pale*	27 (48.21)	46 (35.66)	4 (18.18)	0.1404	0.0202		0.1425
Bleeding*	7 (12.50)	4 (3.10)	0 (0.00)	0.0194	0.1815		1.000
Bristles**							
Regular	23 (41.07)	43 (33.33)	1 (4.54)	0.1100	0.0001		0.0035
Bad/opaque	9 (16.07)	11 (8.53)	0 (0.00)				
Muzzle/ear lesion*	31 (55.36)	36 (27.91)	0 (0.00)	0.0005	<0.0001		0.0022
Onychogryphosis*	33 (58.93)	37 (28.68)	2 (9.09)	0.0001	<0.0001		0.0650
Skin lesion***							
Presence	16 (28.57)	19 (14.73)	3 (13.64)	0.0162	0.0695		0.5727
Ulcer	6 (10.71)	6 (4.65)	0 (0.00)				
Muzzle depigmentation*	23 (41.07)	17 (13.18)	0 (0.00)	<0.0001	0.0002		0.1352
Alopecia*	22 (39.29)	29 (22.48)	2 (9.09)	0.0308	0.0129		0.2511
Blepharitis*	12 (21.43)	8 (6.20)	0 (0.00)	0.0039	0.0159		0.6039
Keratoconjunctivitis**							
Serous	21 (37.50)	12 (9.30)	1 (4.54)	<0.0001	0.0009		0.4693
Mucopurulent	3 (5.36)	4 (3.10)	0 (0.00)				

*Fisher exact test was used. **Positive signal were combined and analyzed by Fisher exact test. ***Chi-square test was used

8. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa multifatorial que é diretamente influenciada por fatores climáticos/ambientais, incidência vetorial e existência de animais reservatório (LAISON; RANGEL, 2005; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014; TRAVI, 2014). A relação hospedeiro/reservatório é um dos fatores mais estudados, pois está relacionada com manutenção do ciclo da doença nas áreas afetadas pelo vetor e parasito (READY, 2014). O cão infectado é o principal reservatório do parasito nas áreas urbanas e conseqüentemente responsável pelo surgimento e estabelecimento da leishmaniose visceral humana (BORGES, *et al.*, 2009; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Assim, o combate a leishmaniose visceral canina (LVC) é um dos eixos de ação mais importante para as políticas de saúde pública (COSTA; TAPETY; WERNECK, 2007; REGUERA, *et al.*, 2016). As normas adotadas pelas autoridades sanitárias até o momento, preconizam o controle da LV através da eutanásia de cães com resultado sorológico positivo para *Leishmania* (DIETZE *et al.*, 1997; BRAGA *et al.*, 1998; COURTENAY *et al.*, 2002; BRASIL, 2003).

A eutanásia dos cães com sorologia positiva para *Leishmania* é considerada uma ação drástica pela sociedade (ASHFORD *et al.*, 1998; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2003; TRAVI, 2014). Assim, como alternativa a esta medida, o tratamento de animais infectados tem surgido como uma das possibilidades que podem mudar essa realidade. Porém, apesar da obtenção de resultados promissores, como redução da carga parasitária e a melhora clínica dos animais, a doença recidiva após a suspensão do tratamento (BANETH; SHAW, 2002; NOLI; AUXILIA, 2005; GHARBI, *et al.*, 2016). Essas recidivas geralmente estão ligadas ao reaparecimento da carga parasitária, permanecendo a importância desses animais no ciclo da doença (MANNA *et al.*, 2008; MANNA *et al.*, 2009; MATEO, 2009; KASZAK.; PLANELLAS; DWORECKA-KASZAK; 2015; YASUR-LANDAU *et al.*, 2016). Sendo assim, para que os tratamentos sejam mais eficientes eles precisam eliminar completamente o parasito ou reduzir o suficiente a carga parasitária para que o sistema imune possa estabelecer uma proteção de memória e evitar recidiva (GOSH; GOSWAMI; ADHYA, 2003; PASSOS, 2014). Nossos estudos tiveram como objetivo principal testar a ação do DETC em cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, visto

que o fármaco possui ação reconhecida contra *Leishmania spp.* em outros modelos experimentais (KHOURI *et al.*, 2009; KHOURI *et al.*, 2010).

8.1 Ação do DETC no tratamento da leishmaniose canina (Capítulo I e II)

No capítulo I, primeiramente, nós testamos a ação leishmanicida do DETC em cultura axênica do parasito, em PBMCs isolados de cães saudáveis e em PBMCs infectados com *Leishmania infantum in vitro*, comprovando que o fármaco é capaz de destruir os parasitos de maneira específica (diminuição da viabilidade das formas promastigostas de cultura axênica, diminuição da viabilidade das formas amastigotas e baixa no citotoxicidade nos PBMCs) através da produção de radicais de superóxido. Em seguida, o DETC também foi testado em um modelo experimental *in vivo* de leishmaniose visceral canina. Neste modelo, cães da raça Beagle foram infectados com grande quantidade de parasito (10^7) associada com saliva do vetor, mimetizando a ocorrência natural da doença. Esse modelo possibilitou o estudo da doença em animais com composição genética semelhantes, mesma idade e alta carga parasitária, aumentando a reprodutibilidade dos resultados encontrados. A drástica redução da carga parasitária dos animais infectados confirma o efeito específico contra o parasito observado nos experimentos *in vitro*. Além disso, os níveis de alanina aminotransferase (ALT) retornaram aos valores normais para a espécie, evidenciando uma melhora da função hepática (KOUTINAS *et al.*, 2001; IKEDA-GARCIA *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2013). Adicionalmente, o tratamento não ocasionou sinais de toxicidade nos animais, comprovando a relativa segurança de administração do fármaco para a espécie canina. Apesar do curto período de tratamento/acompanhamento e o pequeno número de animais, esse primeiro estudo revelou a segurança da administração do DETC para essa espécie e teve um efeito leishmanicida similar aos encontrados em outros modelos experimentais.

No capítulo II, nós avaliamos o efeito do DETC em animais naturalmente infectados. Este estudo foi importante pela necessidade de avaliar a ação do DETC frente à complexidade da doença natural. Fatores inerentes ao animal como diferente constituição genética, idade, raça, peso, parâmetros hematológicos e bioquímicos diferentes, podem ter influência na resposta ao tratamento (CIARAMELA *et al.*, 1997; AMUSATEGUI *et al.*, 2003; PENAFORTE *et al.*, 2013). Além disso, esses animais são provenientes de condições ambientais distintas, como condições precárias de sobrevivência, grau de exposição ao vetor e quantidade de parasitos inoculados, que

podem influenciar no desenvolvimento e severidade da doença (PEARSON; SOUSA, 1996; TRAVI, 2014). Neste estudo, foram realizadas análises hematológicas e bioquímicas durante cinco meses após o início do tratamento e acompanhamos a sobrevivência dos animais por dois anos. Tempos de acompanhamentos maiores são considerados essenciais para avaliar a ação de fármacos contra a LVC (MANNA *et al.*, 2015). Os resultados dos animais tratados com DETC foram comparados com animais tratados com Alopurinol, droga de referência para o tratamento da LVC (KOUTINAS, *et al.*, 2001; BANETH; SHAW, 2002; MIRÓ *et al.*, 2009; PAPADOGIANNAKIS *et al.*, 2010). A ausência de diferença significativa entre os grupos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, evidencia que o tratamento com DETC teve efeito terapêutico comparável ao do Alopurinol, mantendo a maioria dos parâmetros dentro da normalidade para a espécie, evitando assim a evolução da doença (MANNA *et al.*, 2009). Em nosso estudo, não observamos diferença da carga parasitária entre os grupos, provavelmente porque a quantidade de parasitos inicial da maioria dos animais era muito baixa, o que pode ter mascarado a ação dos fármacos contra o parasito. Apesar disto, os animais tratados com DETC apresentaram mais resultados negativos em testes parasitológicos e diminuição significativa do escore clínico quando comparados com os animais tratados com Alopurinol, o que, na maioria das vezes, está associado à maior ação leishmanicida do fármaco.

Apesar do número reduzido de animais e ausência de grupo controle, os dois ensaios realizados possibilitaram validar a ação leishmanicida do DETC na leishmaniose canina.

8.2 Ação *in vitro* e parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizados para avaliar a ação de fármacos para tratar a leishmaniose canina (Capítulo I e II)

A metodologia empregada para as avaliações do estudo está de acordo com a maioria dos trabalhos do gênero (JOÃO, *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007; GÓMEZ-OCHOA, *et al.*, 2009; IKEDA-GARCIA, *et al.*, 2008; MANNA *et al.*, 2009). No estudo *in vitro*, conseguimos demonstrar a capacidade leishmanicida do DETC através da ação direta do fármaco sobre o parasito extracelular (cultura axênica de formas promastigotas) e da ação indireta através do comprometimento da viabilidade do parasito intracelular (ensaios de transformação de formas amastigotas em promastigotas). O aumento na produção de superóxido (O_2^-) pelo DETC confirma o

mecanismo de ação do fármaco já demonstrado por nosso grupo (KHOURI *et al.*, 2010). Os resultados do ensaio *in vitro* foram essenciais para comprovar a baixa citotoxicidade do DETC em células caninas e capacidade leishmanicida contra o parasito.

Para testar a ação de um fármaco no tratamento de cães com LVC é essencial a escolha de parâmetros que reflitam a melhora/cura clínica dos cães (MANNA *et al.*, 2015). Estes devem expressar a ação do fármaco testado sobre o parasito, sobre as respostas que o organismo produza para combater o parasito e, também, evidenciar quaisquer mudanças fisiológicas importantes que possam resultar em prejuízo para o animal (FERREIRA *et al.*, 2013). Acreditamos que a compreensão da alteração desses parâmetros é essencial para a interpretação do resultado do tratamento como um todo.

Os parâmetros mais amplamente utilizados para a avaliação da saúde dos animais são os que compõem os exames denominados de hematológicos (avaliação da série vermelha e da série branca celular) e bioquímicos (BUSH, 2004; LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007; REGUERA *et al.*, 2016).

A avaliação das células vermelhas, ou eritrograma, está intimamente relacionada à avaliação da quantidade e qualidade das hemácias, assim como a concentração da hemoglobina. Além da contagem de hemácias são avaliados o percentual de hematócrito, concentração de hemoglobina, o volume dos glóbulos vermelhos e a quantidade de plaquetas (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007; CARVALHO *et al.*, 2015). Esses parâmetros expressam a situação da concentração de oxigênio no organismo dos animais, pode também permitir o diagnóstico de anemia, que é a diminuição do número de hemácias abaixo das quantidades normais para a espécie ($5,5$ a $8,5 \times 10^6/\mu\text{L}$ – JAIN, 1993), e já foram associados com positividade em testes de diagnóstico moleculares (REBAR, *et al.*, 2003; CECCARELLI *et al.*, 2014). O diagnóstico de anemia é considerado um dos mais importantes marcadores clínicos da LVC. Aliado a isso, a diminuição do hematócrito também tem sido visto como característica dos animais que são capazes de infectar uma maior proporção do inseto vetor (COSTA-VAL *et al.*, 2007; WOERLY *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2012; ALMEIDA-LEAL *et al.*, 2014). Alguns autores relatam que mais da metade dos animais com LVC são diagnosticados com anemia (CIARAMELLA *et al.*, 1997; DE LUNA *et al.*, 2000; KOUTINAS *et al.*, 2001;

ADAMAMA-MORAITOU *et al.*, 2007; COSTA-VAL, 2007; IKEDA-GARCIA *et al.*, 2008; WOERLY *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2012).

Na avaliação da série branca, ou leucograma, a quantidade total de leucócitos é uma informação importante, pois a alteração desse parâmetro pode representar uma estimulação ou inibição da resposta imune (ALLISON, 2015). Independente da resposta gerada, é imprescindível o conhecimento do tipo celular alterado, pois os mecanismos de resposta do hospedeiro podem sofrer interferência direta de acordo com a célula afetada gerando consequências diversas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os leucócitos se dividem em mononucleares (monócitos e os linfócitos) e os polimorfonucleares (basófilos, eosinófilos e neutrófilos) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; ALLISON, 2015). Apesar do entendimento ainda limitado de todas as funções e interações exercidas pelos leucócitos na infecção por *Leishmania*, a maioria de suas ações nas doenças parasitárias é amplamente conhecida (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1999; FREITAS; PINHEIRO 2010). Os monócitos, macrófagos e neutrófilos fazem parte da resposta imune inata, sendo responsáveis pela destruição dos parasitos intracelulares através da produção de moléculas nocivas a estes (RITTIG, BOGDAN, 2000; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). Os linfócitos participam da regulação da resposta imune celular, produção de anticorpos e destruição de células infectadas (BARBIÉRI, 2006; REIS *et al.*, 2010). Os eosinófilos e basófilos estão envolvidos na resposta dos vasos sanguíneos à presença dos parasitos (KAWAKAMI; GALLI, 2002; SARIDOMICHELAKIS, 2009). As funções e interações entre essas células ainda não estão completamente desvendadas e não se restringem a apenas estas (SOLANO-GALLEGO, *et al.* 2009; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

Apesar da ação dessas células contra os protozoários ser mais exercida no local da infecção (RODRÍGUEZ-CORTÉS *et al.*, 2016), mudança no perfil celular da corrente sanguínea pode ser reflexo de um deslocamento de células da medula óssea para esses ambientes. Averiguar a variação na quantidade dessas células se torna uma avaliação importante para determinar o padrão de transporte dessas células nas doenças (CAPRARIIS *et al.*, 2011). Apesar de não existir um comportamento padrão dessas variáveis e alguns trabalhos não mostrarem alterações no perfil hematológico dos animais com LVC (AMUSATEGUI *et al.*, 2003; COSTA-VAL *et al.*, 2007), a diminuição no número de eosinófilos, monócitos e linfócitos tem sido associado a quadros mais severos da LVC (REIS *et al.*, 2006a). Baixa contagem de leucócitos

também foi associada a animais com alta carga parasitária em cães com LVC (REIS *et al.*, 2006b).

A dinâmica da infecção durante leishmaniose visceral ainda não é totalmente esclarecida, mas já foi demonstrada a presença do parasito em diversos órgãos (MANNA *et al.*, 2004; MANNA *et al.*, 2012). Entretanto, os órgãos mais prejudicados são o baço, o tecido hematopoiético, o fígado e os rins (SANTOS-GOMES; CAMPINO; ARRANCHES, 2000; SILVA, 2007; BRASIL, 2014). No baço, as consequências da infecção são aumento do órgão (esplenomegalia) e comprometimento da sua estrutura, que pode prejudicar a resposta imune ao parasito (STRAUSS-AYALI, BANETH, JAFFE, 2007; SANTANA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2014; SILVA-O'HARE *et al.*, 2016). No tecido hematopoiético os resultados da infecção estão atrelados a mudanças no perfil de produção de hemácias e leucócitos, resultando em quadros anêmicos e interferindo na resposta imune (REIS *et al.*, 2006b; NICOLATO *et al.*, 2013).

As alterações com implicações mais graves são as ocorridas no fígado e rins (TAFURI *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2005; RIGO *et al.*, 2013). As desordens nesses órgãos geralmente prejudicam o metabolismo proteico e o equilíbrio hídrico, afetando diretamente o funcionamento de vários outros tecidos e comprometendo a homeostase do organismo (LIMA *et al.*, 2007; BALISTRERI; REJ, 2008). A escolha de parâmetros que reflitam deficiência funcional, lesão e/ou a gravidade da doença tem se tornado essenciais para acompanhar a condição e efeito de tratamentos propostos.

Os parâmetros que melhor representam o estado desses órgãos são os bioquímicos do sangue. As avaliações bioquímicas são compostas por vários testes, existindo uma grande diversidade de moléculas objetivadas e técnicas aplicadas, dependendo do interesse e da necessidade do pesquisador (REIS *et al.*, 2006b; REIS *et al.*, 2009). Contudo, alguns parâmetros acabam sendo comuns em vários estudos (BRUNO *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006a; MEDEIROS *et al.*, 2008; SOLANO-GALENO *et al.*, 2011; MANNA *et al.*, 2015; SILVESTRINI *et al.*, 2016). Em nossos estudos realizamos averiguações os seguintes parâmetros: os níveis de proteínas totais, de albumina, creatinina, ureia, alanina aminotransferase e de fosfatase alcalina.

A concentração de proteínas totais pode sofrer grande influência da dieta e está modificada em diversos estados patológicos. Sua diminuição está relacionada com quadros insuficiência hepática, perda de proteínas por falha renal e alteração do metabolismo (MEYER; HARVEY, 2004). O aumento ocorre em resposta a quadros de

desidratação, respostas inflamatórias e infecciosas (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). Na leishmaniose visceral, os níveis de proteínas totais geralmente estão elevados, principalmente como reflexo do aumento na produção de anticorpos contra o parasito, lesão renal ou hepática (ALMEIDA *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2006a; STRAUSS-AYALI; BANETH; JAFFE, *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2008).

A albumina é uma proteína sintetizada no fígado que compõe grande parte do plasma sanguíneo, tendo como funções principais a manutenção da pressão oncótica e o transporte de substâncias. Seus níveis são influenciados pelo estado nutricional, capacidade de síntese e grau de perda (MEYER; HARVEY, 2004; LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). Em doenças parasitárias, como a leishmaniose visceral, a variação dos níveis de albumina sofre ação direta de dificuldades funcionais dos rins e do fígado, situações que ocorrem com frequência nessa doença (CIARAMELA *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2006a; NICOLATO *et al.*, 2013). A associação da diminuição dos níveis de albumina com a liberação de fatores vasculares culmina na formação de edemas nos membros inferiores observado em alguns animais com a doença (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007; LÓPEZ-PEÑA *et al.*, 2009).

Os níveis de creatinina e de ureia são indicadores indiretos da função renal. A creatinina é um metabólito não proteico da creatina muscular. É o marcador mais utilizado para a lesão renal pois seus níveis independem da dieta do grau de desidratação (BRASIL, 2014). Além disso, seu metabolismo tem como característica singular a excreção realizada por filtração glomerular sem que ocorra excreção ou reabsorção em quantidades significativas dentro do trato urinário (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007; FREITAS *et al.*, 2012). Isso garante que os níveis de creatinina são modificados apenas pela eficiência da filtração glomerular (BALISTRERI; REJ, 2008). Geralmente os níveis de creatinina estão aumentados em animais com LVC, estando mais elevados em cães com estado clínico mais avançado (REIS *et al.*, 2006a; CIARAMELA *et al.*, 1997) e em animais com glomerulonefrite, uma das principais lesões renais encontradas em na LVC (SILVA, 2007).

A ureia é sintetizada no fígado e é o produto final do catabolismo proteico. Apesar de ser excretada quase que inteiramente pelos rins, possui reabsorção de até 40% nos túbulos, sofrendo interferência de fatores fisiológicos, como idade, e da dieta (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). Seus níveis estão elevados em quadros de patologias renais como cálculos, carcinomas, insuficiência renal aguda e pielonefrite (BALISTRERI; REJ, 2008). Na leishmaniose visceral, quando o comprometimento

renal está presente, os níveis estão elevados (CIARAMELA *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2015). Geralmente é utilizada em associação com os níveis de creatinina para definir a função renal, apesar de os níveis de creatinina serem considerados marcadores mais específicos.

A alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (F.A.) são enzimas que participam do metabolismo celular em diferentes órgãos, realizando funções como o controle do equilíbrio proteico e acidobásico (BALISTRERI; REJ, 2008). Entretanto, seus níveis são utilizados como marcadores de lesão e função hepática.

A ALT faz parte das enzimas transaminases, sendo encontrada no plasma e em vários tecidos corpóreos, sendo geralmente associada ao fígado (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). Pode estar aumentada em situações de obstrução dos ductos biliares, gravidez, consumo de alimentos gordurosos ou insuficiência renal (MOTTA, 2003). Provavelmente seja o parâmetro mais exigido e mais importante durante a avaliação de animais com LVC (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). Devido à localização intracelular da enzima nos hepatócitos, as lesões no fígado, encontradas com frequência na LVC, levam à liberação da enzima na circulação e ao aumento dos níveis sanguíneos (CIARAMELA e CORONA, 2003; DIAS *et al.*, 2008).

A fosfatase alcalina (F.A.) é uma isoenzima encontrada em tecidos como intestino, placenta, ossos e rins. Pode estar relacionada a fatores fisiológicos e patológicos nesses órgãos, mas pela sua meia vida curta na espécie canina, suas variações são associadas à função hepática (MEDEIROS *et al.*, 2008). Seus níveis estão aumentados quando ocorre lesão hepática e a sua avaliação geralmente é determinada em conjunto com a ALT (VALLADARES *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2006a; STRAUSS-AYALI; BANETH; JAFFE, *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2009). O aumento nos níveis dessas duas enzimas, em conjunto, é um dos fortes indicadores de lesão hepática, possuindo potencial de expressar não apenas uma evolução da doença para quadros mais graves, mas também para a avaliação da segurança dos fármacos (REGUERA, *et al.*, 2016; ALLISON, 2015).

Visto que esses parâmetros oferecem informações valiosas e úteis na avaliação da saúde dos animais, recomenda-se que eles devam ser utilizados como marcadores de monitoramento clínico-patológico para a evolução da LVC e para o tratamento dos animais como já realizado para outros fármacos (IKEDA *et al.*, 2002; BRUNO *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006a). Acreditamos que a diminuição dos níveis desses marcadores ou retorno a números dentro da faixa de normalidade podem ser

bons indicativos de que o tratamento esteja surtindo efeito positivo no organismo do animal.

8.3 Parâmetros clínicos e desenvolvimento de algoritmos clínicos para avaliação da gravidade da doença (Capítulo III)

Além das análises laboratoriais, a avaliação do estado clínico dos animais tem se destacado, não só no momento da suspeita clínica, mas também no acompanhamento da evolução da LVC (AGUIAR *et al.*, 2007; MIRÓ *et al.*, 2008). Outra aplicação dessa análise é na avaliação da eficiência dos fármacos no tratamento da LVC, visto que a melhora dos sinais clínicos é um dos principais indicativos da eficiência das terapias (BANETH; AROCH, 2008; MANNA *et al.*, 2009). Vários estudos têm mostrado a mudança do quadro clínico de animais submetidos a tratamentos para LVC. Entretanto, o amplo espectro de apresentações clínicas da doença é reflexo de uma complexa interação entre a resposta imune, carga parasitária, parasitos inoculados, condições de sobrevivência e até fatores não estudados como cepa do parasito (COSTA *et al.*, 2013; DOSTALOVA; VOLF, 2013; ALMEIDA-LEAL *et al.*, 2014).

As tentativas de agrupar os animais de acordo com a intensidade e gravidade dos sinais clínicos geralmente estão restritas à divisão dos animais em três grupos: animais assintomáticos (animais sem sinais clínicos sugestivos), oligossintomáticos (animais com poucos sinais ou sinais brandos) ou sintomáticos (animais com muitos sinais e/ou com sinais graves de LVC) (MANCIANTI *et al.*, 1988; COSTA VAL *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2013). Essa classificação pode provocar limitação nos resultados destes estudos pois aloca em um mesmo grupo animais que possuem alterações clínicas consideradas brandas (como onicogribose) e animais com sinais mais graves (como febre, anemia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia). Sendo assim, a padronização da avaliação clínica dos animais pode propiciar a formação de grupos de animais mais homogêneos e a tornar a comparação entre os estudos mais eficientes (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Manna *et al.* (2008) realizaram estudo utilizando um modelo de escore clínico baseado na presença e severidade dos sinais clínicos. Foram estipulados valores para a ocorrência de cada sinal clínico e sua severidade, e a soma desses valores gerou uma pontuação final que foi o escore clínico do animal. Baseado nesse trabalho, foi desenvolvido um método de avaliação clínica para analisar os animais nos estudos

do capítulo I e II. Esse modelo foi adaptado com a inclusão de sinais clínicos mais frequentemente encontrados nos cães na região estudada. Porém, era necessário confirmar se esses sinais clínicos realmente representavam o quadro clínico da LVC. Então, foi desenvolvido um algoritmo de escore clínico baseado nesses sinais clínicos frequentemente encontrados em animais com LVC. Mais de 400 animais foram submetidos a essa análise mostrando que foi possível distinguir entre os animais positivos e negativos para LVC. O algoritmo se mostrou mais eficiente nos animais com escore clínico entre 3 e 9, com uma sensibilidade variando entre 60 e 70% aproximadamente, e área sob a curva de 0,7. Levando-se em conta que foi apenas analisada a presença e intensidade dos sinais clínicos dos animais, este resultado é bastante promissor.

Apesar desses esforços, ainda não foi possível obter uma forma de avaliação que reflita todas as nuances clínicas da LVC. Atualmente, alguns estudos têm explorando outras vias, como Soccá *et al.*, (2016) que incluíram parâmetros importantes na LVC, como componentes das respostas imunológica e inflamatória, como biomarcadores. O estudo dessas alternativas pode auxiliar na formação de um escore clínico mais eficiente, gerando resultados mais sólidos e confiáveis, facilitando um entendimento mais completo da LVC.

9. CONCLUSÕES

- O DETC possui ação leishmanicida direta contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*;
- O DETC diminuiu significativamente a carga parasitária e melhorou a função hepática (alanina aminotransferase - ALT) em cães experimentalmente infectados com *Leishmania infantum*;
- O DETC melhorou significativamente a clínica, aumentou a sobrevida dos cães e confirmou, ainda que de uma maneira indireta, a ação leishmanicida do fármaco em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*;
- O modelo algorítmico desenvolvido foi capaz de avaliar clinicamente cães com LVC.

10. REFERÊNCIAS

- ABENGÓZAR, M. A. *et al.* Mechanisms of action of substituted β -amino alkanols on *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, p. 1211-1218, 2015.
- ADAMAMA-MORAITOU, K. K. *et al.* Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 76, p. 53-57, 2007.
- AGUIAR-SOARES, R. D. *et al.* LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4(+) and CD8(+)) as well as are duction of parasitismo after challenge with *Leishmania infantum* plus salivar gland of *Lutzomyia longipalpis*. **Parasit. Vectors**, v. 7, n. 61, p. 1-10, 2014.
- AGUIAR, P. H. P. *et al.* Clinical profile of naturally infected dogs from an endemic area for "*Leishmania chagasi*" (*infantum*) in Bahia State, Brazil. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.8, n.4, p. 283-294, 2007.
- ALBEROLA, J. *et al.* Safety and Efficacy of Antimicrobial Peptides against Naturally Acquired Leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 2, p. 641–643, 2004.
- ALLISON, R. W. Avaliação laboratorial da função hepática. In: TRRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica clínica veterinária**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2015. cap. 26, p. 258-288.
- ALMEIDA, M. A. *et al.* Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Parasitol.**, v. 127, p. 227–232, 2005.
- ALMEIDA-LEAL, G. G. *et al.* Immunological profile of resistance and susceptibility innaturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, v. 205, p. 472–482, 2014.

ALVAR, J. *et al.* Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 298-319, 1997.

ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol.**, v. 57, p. 81-88, 2004.

ALVAR, J. *et al.* The relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, p. 334-359, 2008.

ALVAR J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2012.

AMUSATEGUI, I. *et al.* Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 18, n. 2, p. 147-56, 2003.

ARAGÃO, L.V.O.; DOURADO, J.C.L.; PACHECO, J.J. **Leishmaniose visceral em Teresina-PI 1995-2006. Avaliação da eliminação de cães soropositivos como medida de controle.** (2010, August 24).

Retrieved from <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0587-1.pdf>. 2008.

ASHFORD, D. A. *et al.* Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med.**, v. 55, p. 53-57, 1998.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

BABIOR, B.M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazil. J. Med. Biol. Res.**, v.30, p.141-155, 1997.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, n. 1, p.33-44, 2000.

BADARÓ R, DUARTE, MIS. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI R, FOCACCIA R. **Tratado de infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 1561-1590.

BALISTRERI W. F.; REJ, R. Função hepática. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **TIETZ Fundamentos de química clínica**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap 31, p.520-551.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 315-324, 2002.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **Vet. J.**, v. 175, p. 14–15, 2008.

BARANWAL, A. K.; MANDAL, R. N.; SINGH, R. Fulminant hepatic failure complicating visceral leishmaniasis in an apparently immunocompetent child. **Ind. J. Pediatr.**, v. 74, n. 5:489-91, 2007.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 8, n. 7, p. 329-337, 2006.

BARBOSA, J. F. et al. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention: A Review of Recent Patents. **Rec. Pat. Endocrinol. Metab. Immune Drug Discov.**, v. 9, n. 2, p. 90-102, 2015.

BARRETO-DE-SOUZA, V. et al. Increased Leishmania replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. **J. Infect. Dis.**, v. 194, n. 6, p. 846-54, 2006.

BERMAN, J. D. et al. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. **Bull. World Health Organ.**, v. 76, p. 25-32, 1998.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev. Infect. Dis.**, v.10, n.3, p.560-86. 1988.

BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **Ind. J. Med. Res.**, v. 123, p. 289-294, 2006.

BIANCIARDI, P. et al. The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v. 93, p. 486-492, 2004.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do Protozoan Parasites Survive inside Macrophages. **Parasitol. Today**, v. 15, p. 22-28, 1999.

BORGES, B.K.A. et al. Animal presence and the risk for transmission of visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, **Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 5, p. 1035-1043, 2009.

BORJA-CABRERA, G. P. et al. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v. 22, n. 17, p. 2234–43, 2004.

BORJA-CABRERA, G.P. et al. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune® vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, p. 597-603, 2010.

BRAGA, M. D. et al. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, p. 419–24, 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvpi.def>.

BROTHERTON, M. C. et al. Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*, **Int. J. Parasitol. Drugs and Drug Resist.**, v. 4, n. 2, p. 126–132, 2014.

BRUNO, G. B. et al. Avaliações hematológicas e bioquímicas do sangue de cães submetidos a pulpotomias com cimento de antibiótico. **Rev. Odontol. UNESP**, v.35, n. 3, p. 125-133, 2006.

BUSH, B. M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. 3 ed. São Paulo: Roca. 2004. p. 384, p. 100-148.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; JÚNIOR, C. P. Avaliação da Efetividade da Utilização de Coleiras Impregnadas com Deltametrina a 4% para o Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Resultados Preliminares. **Inf. Mensal sobre Agravos à Saúde Públ.**, v. 1, n.12, 2004.

CANTACESS, C. et al. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends Parasitol.**, v. 31, n. 3, p. 100-108, 2015.

CAPRARIIS, D. et al. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. **Vet. Microbiol.**, v. 149, p. 206–212, 2011.

CARNIELLI, J. B. et al. Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum chagasi* isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. **J. Proteom.**, vol. 108, p. 198– 208, 2014.

CASSATELLA, M. A. et al. On the production of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apop-2L) by human neutrophils. **J. Leukoc. Biol.** v. 79, p. 1140-1149, 2006.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Visceral leishmaniasis**. Acesso em 06 de setembro 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites>>.

CARVALHO, F. S. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in dogs in Brazil: epidemiology, co-infection, and clinical aspects. **Genet. Mol. Res.**, v. 14, n. 4, p. 62-73, 2015.

CECCARELLI, M. et al. Application of qPCR in conjunctival swab samples for the evaluation of canine leishmaniasis in borderline cases or disease relapse and correlation with clinical parameters. **Parasit. Vectors**, v. 7, n. 460, p. 1-12, 2014

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 141, p. 539-543, 1997.

CIARAMELLA P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Vet. Learn**, v. 25, p. 358-368, 2003.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. **Amino Acids**, v. 40, p. 269-285, 2011.

COSTA, C. H. N. et al. Competence of the Human Host as a Reservoir for *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 997–1000, 2000.

COSTA, C. H. N. et al. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 99, p. 229-236, 2005.

COSTA, C. H. N.; TAPETY, C. M. M.; WERNECK, G. L. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 4, p. 415-419, 2007.

COSTA, D. J. et al. Experimental Infection of Dogs with Leishmania and Saliva as a Model to Study Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, n. 8, v. 4, 2013.

COSTA, F. A. L. et al. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. **Infect. Dis.**, v. 10, p. 1-12, 2010.

COSTA-VAL, A. P. et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet. J.**, v. 174, n. 3, p. 636-43, 2007.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect. Dis.**, v. 186: 1314–20, 2002.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 111-126, 2006.

CURI, N. H.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of Leishmania infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 99-101, 2006.

DAMASCENO, D. C. et al. Radicais livres, estresse oxidativo e diabetes. **Diab. Clín.**, v. 5, n. 5, p. 355-361, 2002.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigm of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 48, p. 151–156, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Best Practices for Preventing Vector-Borne Diseases in Dogs and Humans. **Trends Parasitol.**, v. 32, n. 1, p. 43-55, 2016.

DAS, V. N. et al. A controlled, randomized nonblinded clinical trial to assess the efficacy of amphotericin B deoxycholate as compared to pentamidine for the treatment of antimony unresponsive visceral leishmaniasis cases in Bihar, India. **Ther Clin. Risk Manag.**, v. 5, n. 1, p.117-24, 2009.

DE FREITAS, J. C. C. et al. Profile of anti-Leishmania antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.**, v. 93, p. 705–9, 2012.

DE LUNA, R. et al. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. **J. Comp. Path.**, v. 122, p. 213-216. 2000.

DIAS, E. L. et al. Canine Visceral Leishmaniasis (Cvl): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic área of São José de Ribamar municipality, Maranhão State, Brazil, **Ciê. Animal Bras.**, v. 9, n. 3, p. 740-745, 2008.

DIETZE, R. et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 240–242, 1997.

DOMÍNGUEZ, M. et al. Early mechanisms of Leishmania infection in human blood. **Microb. Infect.**, v. 5, p. 507–513, 2003.

DOSTALOVA, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite- vector interactions overview. **Parasit. Vectors.**, v. 5, n. 276.p. 1-12, 2013.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. L. Forty years of visceral leishmaniasis in the state of Piauí: a review. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 53, n. 1, p. 3-11, 2011.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 2, p. 125-30, 1996.

EVANS, T. G. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 166, n. 5, p. 1124-1132, 1992.

FRAGA, D. B. et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: a 13 years survey and association with human disease. **Vet. Parasitol.**, v. 190, n. 3, p. 591-4, 2012.

FERREIRA, A. L. et al. Hematological changes induced by conventional and alternative medicines. **Rev. Bras. Farm.**, v. 94, n. 2, p. 94-101, 2013.

FREITAS, J. C. C., PINHEIRO, D. C. S. N. Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **Rev. Portug. Ciên. Vet.**, v. 105, p. 11-20, 2010.

FREITAS, J. C. et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 1, p. 24-9, 2012.

GANTT, K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J. Immunol.**, v. 167, p. 893- 901, 2001.

GHARBI M. et al. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. **Rev. Sci. Tech.**, v. 34, n. 2, p. 613-26, 2015.

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

GONZÁLEZ, U. et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 5, n. 8, p. 1-103, 2015.

GOSH, S.; GOSWAMI, S.; ADHYA, S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. **Bioch. J.**, v. 369, p. 447-452, 2003.

GUARGA, J. L. et al. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 88, n. 1, p.13–20, 2002.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Adv. Parasitol.**, v. 44, p. 2–39, 2000.

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

HERWALDT, B. L. et al. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostan) and review of pertinent clinical studies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 46, p. 296-306, 1992.

HIAM, A. et al. Microtubule target for new antileishmanial drugs based on ethyl 3-haloacetamidobenzoates. **J. Enz. Inhib. Med. Chem.**, v. 21, n. 3, p. 305–312, 2006.

HÜBNER, L. et al. Enhancement of monocyte antimycobacterial activity by diethyldithiocarbamate (DTC). **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 13, n. 8, p. 1067-72, 1991.

IKEDA, F. A. et al. Perfil hematológico de cães infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: estudo retrospectivo de 191 casos. **Clín. Vet.**, n. 47, p. 42-48, 2002.

IKEDA-GARCIA, F. A. et al. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Vet. Parasitol.**, v. 143, n. 3-4, p. 254-9, 2007.

IKEDA-GARCIA, F. A. et al. Hematological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 45, p. 68-74, 2008.

INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM (IRIS). Sodium diethyldithiocarbamate (CASRN 148-18-5) [Internet]. United States of America: **U.S. Environmental Protection Agency** [updated 2009 Jul 6]. <Disponível em: <<http://www.epa.gov/iris/subst/0102.htm>>.

JAIN, N., C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.,

JAMIL, K. M. et al. Effectiveness Study of Paromomycin IM Injection (PMIM) for the Treatment of Visceral Leishmaniasis (VL) in Bangladesh. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 10, p. 1-9, 2015.

JAMSHIDI, S. H. et al. Immunotherapy Using Autoclaved *L. major* Antigens and *M. vaccae* with Meglumine Antimoniate, for the Treatment of Experimental Canine Visceral Leishmaniasis. **Iran. J. Parasitol.**, v. 6, n. 2, p.26-34, 2011.

JERONIMO, S. B. M. et al. Na urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 88, p. 386-388, 1994.

JOÃO, M. A. et al. Canine Leishmaniasis Chemotherapy: Dog's Clinical Condition and Risk of Leishmania Transmission. **J. Vet. Med.**, v. 53, p. 540-545, 2006.

KASZAK, I.; PLANELLAS, M.; DWORECKA-KASZAK, B. Canine leishmaniosis – an emerging disease. **Ann. Parasitol.**, v. 61, n. 2, p. 69–76, 2015.

KAWAKAMI, T.; GALLI, S. J. Regulation of mast cell and basophil function and survival by IgE. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 773-786, 2002.

KERR, M.G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. p. 61-80.

KHOSHDEL, A. et al. Increased Levels of IL-10, IL-12, and IFN- γ in Patients with Visceral Leishmaniasis. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 13, n. 1, p. 44- 46, 2009.

KHOURI, R. et al. IFN- β Impairs Superoxide-Dependent Parasite Killing in Human Macrophages: Evidence for a Deleterious Role of SOD1 in Cutaneous Leishmaniasis. **J. Immunol.**, n. 182, 2525-253, 2009.

KHOURI, R. et al. DETC induces Leishmania parasite killing in human in vitro and murine in vitro models: a promising therapeutic alternative in leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1-9, 2010.

KHOURI, R. et al. SOD1 Plasma Level as a Biomarker for Therapeutic Failure in Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 210, n. 2010, p. 306-310, 2014.

KOFF, A. B.; ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, n. 5, p. 693-708, 1994.

KOUTINAS, A. F. et al. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.** v. 98, n. 4, p. 247-61, 2001.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Vet. Pathol.**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

KUMARI, S. et al. A. Discovery of novel vaccine candidates and drug targets against visceral leishmaniasis using proteomics and transcriptomics. **Curr. Drug Targets**, v. 9, n. 11, p. 938–947, 2008.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New world leishmaniasis – The neotropical *Leishmania* species. In: COX, F. E. G.; KREIER, J. P.; WAKELEN, D. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 8^a ed. England, London, 2006.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811–827, 2005.

LEANDRO, C. et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 79, n. 3, p.273-84, 2001.

LIMA, I. S. et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLoS One**, v 3, n, 9, p. 1-9, 2014.

LIMA, W.G. et al. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.117, p.129-136, 2007.

LISTE-BURILLO, F. et al. Iron status and anemia in canine leishmaniasis. **Rev. Méd. Vét.**, v. 3, p. 171-176, 1994.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3ª ed. Santa Maria: BSCCR, UFSM, 2007. p. 5-40, 60-80.

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALEZ, M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **J. Vet. Med.**, v. 43, p. 460-474, 1996.

LÓPEZ-PEÑA, M. et al. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. **Acta Vet. Scand.**, v. 51, n. 1, p. 1-3, 2009.

LUPPI, M. M. et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 155, p. 146-151, 2008.

MAIA, C et al. Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. **Acta Trop.**, v. 116, p. 193-199, 2010.

MAJID, D. S.; KOPKAN, L. Nitric oxide and superoxide interactions in the kidney and their implication in the development of Salt-sensitive hypertension. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 34, p. 946–952, 2007.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.

MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 125, p. 251–262, 2004.

MANNA, L. et al. Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet. J.**, v. 177, p. 279–282, 2008a.

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

MANNA, L. et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. **Vet. J.**, n. 182, p. 441–445, 2009.

MANNA, L. et al. Detection of Leishmania parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. **Parasites & Vect.**, v. 5, n. 216, p. 1-4, 2012.

MANNA, L. et al. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasites & Vect.**, v. 8, n. 289, p. 2-9, 2015.

MARQUES, C. et al. Efficacy of the liposome trifluralin in the treatment of experimental canine leishmaniosis. **Vet. J.**, v. 178, p. 133–137, 2008.

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

McBRIDE, A. G.; BORUTAITE, V.; BROWN, G. C. Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and subsequent cell death. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1454, p. 275-288, 1999.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Haematological profile of dogs with visceral leishmaniasis in the city of Fortaleza, Ceará. **Ciê. Animal**, v. 18, n. 1, p. 43-50, 2008.

MENEZES, J. P. B. et al. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. **BioMed. Research International**. v. 15, p. 1- 11, 2015.

MEYER, D. J. Proteínas plasmáticas. In: **Medicina de laboratório veterinária: Interpretação e diagnóstico**. 3ed. São Paulo: Roca, 2004, 351p., p. 156-168.

MILLER, M. A. et al. Inducible Resistance to Oxidant Stress in the Protozoan *Leishmania chagasi*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 33883-33889, 2000.

MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 8, p. 371- 377 2008.

MIRÓ, G. et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and alopurinol for canine leishmaniosis. **Vet. Dermatol.**, n. 20, v.6, p. 397–404, 2009.

MISHRA, M. et al. Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kala-azar. **Lancet**, v. 340, p. 1256-1257, 1992.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório**. 3ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. Cap.9, p. 108-120. 419p.

MONGE-MAILLO, B. LÓPEZ-VÉLEZ, R. R. Therapeutic Options for Visceral Leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, p.1863–1888, 2013.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 399-405, 2002.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

NICOLATO, R. C. et al. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. 1-9, 2013.

NOLI, C.; AUXILIA, S.T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Vet. Dermatol.**, v. 16, p. 213-232, 2005.

NOLI, C.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **The Vet. J.**, v. 202, p. 425–435, 2014.

NUNES, C. M. et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Vet. Parasitol.**, n. 170, p. 131– 133, 2010.

NÝLEN S, SACKS D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends. Immunol.**, v. 28, n. 9, p. 378-384, 2007.

OLIVA, G. et al. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 36, n. 6, p. 1013-9, 1995.

OLIVA, G. et al. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 236, n. 11, p. 1-10, 2010.

OLIVEIRA. A. G.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. First record of finding *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in the urban area of Brazil. **Rev. Saude Publ.**, v. 6: p. 654-5, 2000.

OLIVEIRA, C. L. et al. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994–1997. **Cad. Saúde Públ.**, v. 17, p.1231–1239, 2001.

OLIVEIRA, F. M. L. **Ações de controle da leishmaniose visceral em Teresina/PI.** 2014. 57f. Tese (Doutorado em ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.

OLIVEIRA, J. M. et al. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 2, p. 188-193, 2010.

OLIVEIRA, S. S.; ARAÚJO, T. M. Evaluation of control measures for visceral leishmaniasis (kala azar) in an endemic área in Bahia, Brazil (1995-2000). **Cad. Saúde Públ.**, v. 19, n. 6, p. 1681-1690, 2003.

PACE, D. Leishmaniasis. **J. Infect.**, v. 69, p. 10-18, 2014.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. **An. Acad. Bras. Cienc.**, n. 76, n. 3, p.583-93, 2004.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. & Hyg.**, v. 65, p. 510-517, 2001.

PAPADOGIANNAKIS, E. et al. Determination of CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of dogs with leishmaniosis before and after prolonged allopurinol monotherapy. **Vet. J.**, v. 186, n. 2, p. 262-3, 2010.

PARAMCHUK, W. J. et al. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 90, n. 1, p. 203-21, 1997.

PASSOS, S.R.; RODRIGUES, T.A.; MADUREIRA, A.P.; GIUNCHETTI, R.C.; ZANINI, M.S. Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with furazolidone and domperidone. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 44, p. 463-465, 2014.

PASTORINO, A. C. et al. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. **J. Pediatr.**, v. 78, n. 2, p. 120-7, 2002.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, n. 1, p. 1-11, 1996.

PENAFORTE, K. M. et al. Leishmania infection in a population of dogs: an epidemiological investigation relating to visceral leishmaniasis control. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 4, p. 592-596, 2013.

PENICHE, A. G. et al. Antileishmanial Activity of Disulfiram and Thiuram Disulfide Analogs in an Ex Vivo Model System Is Selectively Enhanced by the Addition of Divalent Metal Ions. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 59, n. 10, p.6463-70, 2015.

PENNISI, M.G. et al. Clinical efficacy of two different drug combinations for the treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Res. Commun.**, 32, S303-S305, 2008.

PEREZ-VICTORIA, F. J; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 47, p. 2397–403, 2003.

PEREZ-VICTORIA, F. J. et al. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use. **Drug. Resist. Updat.**, v. 9, p. 26–39, 2006.

PETERSEN, A. L. et al. 17-AAG kills intracellular *Leishmania amazonensis* while reducing inflammatory responses in infected macrophages. **PLoS One**, v. 7, p. 1-9, 2012.

PINELLI, E. et al. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 1, 229-35, 1994.

PROVERBIO, D. et al. Relationship between Leishmania IFAT Titer and Clinicopathological Manifestations (Clinical Score) in Dogs. **BioMed Res. Int.**, v.1, p. 1 – 5, 2014.

RAGUSA, R. et al. Treatment of visceral leishmaniasis with meglumine and allopurinol. **Am. J. Dis. Child.**, v. 147, n. 611–2, 1993.

RAHMAN, M. et al. Phase IV trial of miltefosine in adults and children for treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Bangladesh. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, p. 66–9, 2011.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Review. **Clin. Epidemiol.**, v. 6, p. 147–154, 2014.

REBAR, A.H. et al. **Hematologia para Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2003. p. 81-129.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.**, v. 81, p. 68–75. 2006a

REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. Exp. Immunol.**, v.146, p. 303–311, 2006b.

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

REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v. 26, n. 7, p. 341-349, 2010.

REISINGER, E. C. et al. Inhibition of HIV progression by dithiocarb. **Lancet.**, v. 335, p. 679-82, 1990.

REGUERA, R. M. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 227, p.98–114, 2016.

RIBEIRO, R. R. et al. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 3, p. 373-378, 2013.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31: p.143– 148, 1998.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 2, n. 59. P1-8, 2012.

RIERA, C. et al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. **Vet. Parasitol.**, v. 84, n. 1, p. 33-47, 1999.

RIGO, R. S. et al. Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** v. 55, n. 2, p. 113-6, 2013.

RIJAL, S.; et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clin. Infect. Dis.**, v. 56, p. 1530–8, 2013.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania – Host-Cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitol. Today**, v. 16, p.292-297, 2000.

ROATT, B. M. et al. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. **Front. Immunol.**, v. 5, n. 272, p. 1-10, 2014.

RODRIGUES, C. A. T. et al. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. **Vet. Parasitol.**, v. 143, n. 3-4, p. 197-205, 2007.

RODRIGUES, O. R. et al. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. **Immunobiology**, v. 214, n. 2, p. 101-11, 2009.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. 1-5, 2016.

ROSEN, G.M. et al. Free radicals and phagocytic cells. **The FASEB J.**, v. 9, p. 200-209, 1995.

SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunol.**, v. 30, n. 10, p. 515-24, 2008.

SANTOS, D. M. et al. Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 10, p. 1-11, 2014.

SANTOS, F. N. et al. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6176–90, 2007.

SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine Experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 193-198, 2000.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. **Vet. Dermatol.**, v. 20, p. 471-489, 2009.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.

SCHETTINI, D.A. et al. Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 269-272, 2003.

SCHETTINI, D. A. et al. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **Int. J. Pharm.**, v. 315, p. 140–147, 2006.

SHERLOCK, I. A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 511, 1984.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, **Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 96, n. 3, p.285-91, 2001.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Rev. Trop. Ciên. Agrárias e Biol.**, v. 1, p. 20-31, 2007.

SILVA, J. G. D. et al. Natural infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania sp.* in Teresina, Piauí State, **Brazil. Cad. Saúde Públ.**, v. 23, p. 1715-1720, 2007.

SILVA, J. S. et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2012.

SILVA-O'HARE, J. et al. Disruption of Splenic Lymphoid Tissue and Plasmacytosis in Canine Visceral Leishmaniasis: Changes in Homing and Survival of Plasma Cells. **PLoS One**, v. 31, n. 5, p. 1-10, 2016.

SILVESTRINI, P. et al. Clinical leishmaniasis in dogs living in the UK. **J. Small Animal Pract.**, v. 57, p. 453–458, 2016.

SINGH, U. K. et al. Amphotericin B therapy in children with visceral leishmaniasis: daily vs. alternate day, a randomized trial. **J. Trop. Pediatr.**, v. 56, p. 321–4, 2010.

SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 675, p. 1-11, 2010.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. **Vet. Quart.**, v. 10, p. 1-16, 1988.

SOARES M. J. V. et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 11, n.4, p.579-593, 2005.

SOARES, M. R. et al. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Trop.**, v. 117, p. 6-9, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vect.**, v. 4, p.86 – 101, 2011.

SOLCÁ, M. S. et al. Circulating Biomarkers of Immune Activation, Oxidative Stress and Inflammation Characterize Severe Canine Visceral Leishmaniasis. **Scien. Rep.**, v. 6, p. 1-7, 2016.

SPATH, G. F. et al. The role (s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proc. Nat. Acad. Sc. USA**, v. 100, n. 16, p. 9536-9541, 2003.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet. Res.**, v. 38, p. 547–564, 2007.

SUNDERMAN, F. W.; PAYNTER, O. E.; GEORGE, R. B. The effects of the protracted administration of the chelating agent, sodium diethyldithiocarbamate (dithiocarb). **Am. J. Med. Sci.**, v. 254, n. 1, p. 24-34, 1967.

TAFURI, W.L. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 96, p. 203-212, 2001.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K.K. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v.42, p.1075–81, 2003.

TÁVORA, L. G. F.; NOGUEIRA, M. B.; GOMES, S. T. Visceral Leishmaniasis/HIV co-infection in northeast Brazil: evaluation of outcome. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 7, n. 4, p. 1-10, 2015.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. & Hyg.**, v. 52, p. 287-292, 1995.

THAKUR, C. P. et al. Amphotericin B in resistant kala-azar in Bihar. **Natl. Med. J. India.**, v. 6, p. 57–60, 1993.

TORRUS, D. et al. Fluconazole plus allopurinol in treatment of visceral leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 37, p. 1042–3, 1996.

TRAVI, B.L. et al. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Res. Vet. Sci.**, v. 72, n. 1, p. 83–86, 2002.

TRAVI, B. L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. **Biomédica**. v. 34, p. 7-12, 2014.

VALLADARES, J.E. et al. Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 141, n. 21, p. 574-575, 1997.

VERÇOSA, B. L. A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Vet. Res.**, v. 4, p. 1-7, 2008.

VERMEERSCH, M. et al. In vitro Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences. **Antim. Agents Chemoth.**, v. 53, p. 3855-3859, 2009.

VEXENAT, J. A. et al. Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidine (paromomycin). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 448-453, 1998.

VOULDOUKIS, I. et al. Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. **Vet. Parasitol.**, v. 135, p. 137-46, 2006.

WALKER, E. M. J. et al. Effects of diethyldithiocarbamate and structural analogs in mice with systemic candidal infections. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 56, n. 2, p. 253-63, 1987.

WALKER, S. et al. Amphotericin B in lipid emulsion: stability, compatibility, and in vitro antifungal activity. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 762-766, 1998.

WELBURN, S. C. et al. The neglected zoonoses—the case for integrated control and advocacy. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 21, n. 5, p. 433-443, 2015.

WERNECK, G. L. et al. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiol. Infect.**, v. 135, p. 195-201, 2007.

WOERLY, V. et al. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v. 105, p. 463-469, 2009.

WYLLIE, S. et al. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. **Sci. Transl. Med.**, v. 4, n. 119, p. 1-10, 2012.

YASUR-LANDAU, D. et al. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 1, 2016.