



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

JÉSSICA CRISTIANNE MAZER BERNARDI

**AVALIAÇÃO DO MIELOGRAMA E DA CARGA PARASITÁRIA EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS A
TRATAMENTO EXPERIMENTAL COM DOMPERIDONA ASSOCIADA A
ALOPURINOL**

RECIFE
2020

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

JÉSSICA CRISTIANNE MAZER BERNARDI

**AVALIAÇÃO DO MIELOGRAMA E DA CARGA PARASITÁRIA EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS A
TRATAMENTO EXPERIMENTAL COM DOMPERIDONA ASSOCIADA A
ALOPURINOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal. Área de Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Edna Michelly de Sá Santos

RECIFE

2020

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

- B523a Bernardi, Jéssica, Jéssica Cristianne, Mazer
Avaliação do mielograma e da carga parasitária em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* submetidos a tratamento experimental com domperidona associada a alopurinol / Jéssica, Jéssica Cristianne, Mazer Bernardi. - 2020.
68 f. : il.
- Orientador: Leucio Camara Alves.
Coorientador: Edna Michelly de Sa .
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.
1. Cães. 2. Leishmaniose visceral. 3. Medula óssea. 4. Mielograma. 5. Tratamento . I. Alves, Leucio Camara, orient. II. , Edna Michelly de Sa, coorient. III. Título

JÉSSICA CRISTIANNE MAZER BERNARDI

**AVALIAÇÃO DO MIELOGRAMA E DA CARGA PARASITÁRIA EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS A
TRATAMENTO EXPERIMENTAL COM DOMPERIDONA ASSOCIADA A
ALOPURINOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal. Área de Medicina Veterinária.

19 de fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves – Departamento de Medicina Veterinária/ UFRPE
(Presidente)

Prof. Dr. Victor Fernando Santana Lima – Núcleo de Medicina Veterinária/ UFS (1º
membro)

Profª. Drª. Edna Michelly de Sá Santos – Departamento de Medicina Veterinária/
UFRPE (2º membro)

Dr. Carlos Adriano de Santana Leal – Técnico Administrativo - Departamento de
Medicina Veterinária UFRPE (3º membro)

Profª. Drª. Maria Aparecida da Glória Faustino – Departamento de Medicina Veterinária/
UFRPE (Suplente)

*Ao meu marido, Francisco,
e as nossas filhas peludas, Preta e Bela.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado até aqui, por ter me dado saúde e força nos momentos mais difíceis e, principalmente, por todas as conquistas ao longo desse trabalho.

A Francisco de Assis Leite Sousa, por ser meu melhor amigo, companheiro, namorado, confidente, parceiro... Que seja pra sempre assim, nós dois, dividindo problemas e somando alegrias. Você faz tudo ficar mais leve. Te amo demais. Obrigada por tudo que você é na minha vida!

A Preta, Bela e Bolinha (*in memoriam*), nunca serei capaz de retribuir tamanho amor.

A minha família, que mesmo distante me apoia e me motiva.

Ao orientador, prof. Dr. Leucio Câmara Alves, pela oportunidade de trabalhar no LDP durante dois anos e pelos ensinamentos a mim passados.

A co-orientadora, Prof^ª. Edna Michelly de Sá Santos, por ser muito mais que orientadora, sempre disposta a ouvir e aconselhar.

Ao prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos, por sempre tirar minhas dúvidas e me orientar, mesmo nas suas vindas rápidas e atarefadas a Recife.

Aos amigos Yuri Albuquerque e Scheilla Melo, por serem pessoas maravilhosas, sempre procurando ajudar como podem.

Aos colegas do laboratório de Doenças Parasitárias, especialmente a Talita Lins, Winny Gomes e Laís Ribeiro. Agradeço por todos os cafés e por todas as conversas na copa e no Whatsapp. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Aos médicos veterinários Carlos Adriano de Santana Leal e Diogo Manoel Farias da Silva, pela paciência e ensinamentos na biologia molecular.

A Dr^ª Milena de Paiva Cavalcanti e ao seus orientados, pela disponibilidade na realização da qPCR.

Aos meus pacientes e seus tutores, por acreditarem no trabalho de toda a equipe do LDP, tornando essa pesquisa possível.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Departamento de Medicina Veterinária por fornecerem as instalações para a realização deste trabalho, e à CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.
Muito obrigada!

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica crônica, na qual os cães podem ser assintomáticos como também podem apresentar uma variedade de sinais clínicos inespecíficos. As alterações nos exames laboratoriais são uma manifestação importante na LVC e que, se não acompanhados, pode levar o animal a morte. Alguns estudos já vêm mostrando que essas alterações podem estar relacionadas as mudanças na produção e/ou diferenciação das diferentes linhagens celulares na medula óssea, em consequência da infecção por *Leishmania* sp. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações no mielograma e quantificar a carga parasitária na medula óssea de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e submetidos a tratamento experimental. Para isso, foram utilizados 10 cães, adultos, que foram tratados por 30 dias com a associação de alopurinol (10mg/kg/BID) e domperidona (1mg/kg/SID). As punções de medula óssea foram realizadas no dia zero e 30 dias após o início do tratamento, onde foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro, fixadas e coradas para avaliação citológica. Para a qPCR a medula óssea foi acondicionada em micrutubos com EDTA 3% para posterior extração de DNA e quantificação. O mielograma dos animais revelou, no dia zero, redução no número de metarrubricitos, promielócito, mielócito neutrofílicos, metamielócito neutrofílicos, bastonete neutrofílicos e megacariócitos, e aumento no número de neutrófilos e macrófagos. No dia 30 foi observado redução no número de metarrubricitos, prorrubricitos, promielócito, mielócito neutrofílicos, metamielócito neutrofílicos, bastonete neutrofílicos, e megacariócitos. Observou-se também aumento no número de neutrófilos, macrófagos e plasmócitos, além de aumento discreto na relação mieloide:eritróide. Com relação as alterações morfológicas, foi observado binucleação celular (2/10) e presença de mitoses atípicas (2/10). Leucofagocitose foi observada em 20% (2/10) dos animais. Em 70% dos animais, formas amastigotas de *Leishmania* sp. foram visualizadas após tratamento. A carga parasitária da medula óssea revelou que 54,5% dos animais apresentaram diminuição da carga parasitária, enquanto 45,4% apresentaram aumento na quantificação 30 dias após o tratamento. A quantificação média no dia zero e no dia 30 foi de 4.424,82 e 16.673,2 parasitas/ μ L, respectivamente, mas não houve diferença significativa entre os períodos estudados ($p = 0,05$). Com esses resultados sugere-se que o mielograma não seja a melhor ferramenta para o acompanhamento de cães com LVC quando se objetiva avaliar a resposta do paciente num curto período de tratamento e que 30 dias de tratamento não é suficiente para observar uma resposta parasitológica satisfatória, sendo necessário um estudo de longo prazo para entender os possíveis mecanismos associados a carga de parasitas da medula óssea durante o tratamento da leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: Cães. Leishmaniose visceral. Medula óssea. Mielograma. Tratamento.

ABSTRACT

A Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a chronic systemic disease, in which dogs can be asymptomatic but can also exhibit a variety of nonspecific clinical signs. Changes in laboratory tests are an important manifestation in CVL and, if not followed up, can lead to the death of an animal. Some studies already show that these changes may be related to changes in the production and/or differentiation of different cell lines in the bone marrow, as a result of infection by *Leishmania* sp. Thus, the objective of this study was to evaluate changes in the myelogram and quantify the parasitic load on the bone marrow of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and submitted to experimental treatment. For that, 10 adult dogs were used, which were treated for 30 days with the combination of allopurinol (10mg/kg/BID) and domperidone (1mg/ kg/SID). Bone marrow punctures were performed on day zero and 30 days after the start of treatment, where smears were made on glass slides, fixed and stained for cytological evaluation. For the qPCR, the bone marrow was packed in micrutubes with 3% EDTA for subsequent DNA extraction and quantification. The animals' myelogram revealed, on day zero, a reduction in the number of metarubricyte, promyelocytes, neutrophilic myelocytes, neutrophilic metamyelocytes, neutrophilic band and megakaryocytes, and an increase in the number of neutrophils and macrophages. On the 30th, a reduction in the number of metarubricytes, prorubrocytes, promyelocytes, neutrophilic myelocytes, neutrophilic metamyelocytes, neutrophilic band and megakaryocytes was observed. There was also an increase in the number of neutrophils, macrophages and plasma cells, in addition to a slight increase in the myeloid:erythroid ratio. Regarding morphological changes, cell binucleation (2/10) and atypical mitosis (2/10) were observed. Leukophagocytosis was observed in 20% (2/10) of the animals. In 70% of the animals, amastigote forms of *Leishmania* sp. were visualized after treatment. The bone marrow parasitic load revealed that 54.5% of the animals showed a decrease in the parasitic load, while 45.4% showed an increase in quantification 30 days after treatment. The mean quantification on day zero and day 30 was 4,424.82 and 16,673.2 parasites/ μ L, respectively, but there was no significant difference between the periods studied ($p=0.05$). With these results, it is suggested that the myelogram is not the best tool for monitoring dogs with CVL when the objective is to assess the patient's response in a short period of treatment and that 30 days of treatment is not enough to observe a satisfactory parasitological response, requiring a long-term study to understand the possible mechanisms associated with the load of bone marrow parasites during the treatment of canine visceral leishmaniasis.

Key words: Dogs. Visceral leishmaniasis. Bone marrow. Myelogram. Treatment.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 Leishmaniose Visceral | 14 |
| 2.2 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)..... | 14 |
| 2.2.1 Transmissão e ciclo biológico..... | 15 |
| 2.2.2 Resposta Imune na LVC | 16 |
| 2.3 Medula óssea e células hematopoiéticas..... | 17 |
| 2.3.1 Alterações na medula óssea associadas à LVC | 20 |
| 2.4 Diagnóstico da LVC..... | 21 |
| 2.4.1. Diagnóstico parasitológico | 21 |
| 2.4.2. Diagnóstico sorológico | 22 |
| 2.4.3. Diagnóstico molecular | 23 |
| 2.5 Tratamento da LVC | 23 |
| 3 OBJETIVOS | 26 |
| 3.1 Geral | 26 |
| 3.2 Específicos | 26 |
| REFERÊNCIAS..... | 27 |
| CAPÍTULO I | 42 |
| RESUMO | 43 |
| ABSTRACT | 44 |
| 1 Introdução | 45 |
| 2 Material e Métodos..... | 46 |
| 2.1 População estudada..... | 46 |
| 2.2 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina | 46 |
| 2.3 Tratamento | 46 |
| 2.4 Mielograma | 47 |
| 2.5 Análise Estatística | 47 |
| 3 Resultados | 47 |
| 4 Discussão..... | 49 |
| 5 Conclusão | 51 |

| | |
|----------------------------------|----|
| Referências | 52 |
| CAPÍTULO II | 56 |
| ABSTRACT | 57 |
| 1 Introduction | 58 |
| 2 Materials and Methods | 59 |
| 2.1 Animal selection | 59 |
| 2.2 Treatment..... | 59 |
| 2.3 Bone marrow collection | 59 |
| 2.4 Parasitic load..... | 59 |
| 2.5 Statistical analysis | 60 |
| 3 Results | 60 |
| 4 Discussion | 61 |
| 5 Conclusion | 64 |
| Bibliographic reference..... | 65 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Diferenciação de células-tronco pluripotenciais em linhagens celulares comprometidas do sistema hematopoiético..... | 19 |
|--|----|

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma importante enfermidade parasitária que se encontra em 89 países (KASHIF et al., 2017). Acredita-se que 1,7 bilhão de pessoas vivem em áreas de risco para a infecção (PIGOTT et al., 2014) o que resulta em aproximadamente 1,5 a 2 milhões de novos casos por ano, com 94% dos casos ocorrendo principalmente em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, e Sudão (BURZA et al., 2018).

Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a LV como uma doença tropical negligenciada (DTN) devido à falta de atenção concedida pela indústria farmacêutica. Desta forma altas taxas de mortalidade (até 90%) podem ser observadas em pacientes não tratados (PELLISSARI et al., 2011). A LV possui como principais agentes causais a *Leishmania donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e a *Leishmania major* (KARAMI et al., 2007).

No Brasil, a doença encontra-se distribuída nas cinco regiões brasileiras, com registro de casos em 23 unidades federativas até 2017 (JUNIOR, 2018), sendo a Região Nordeste a mais atingida (DANTAS-TORRES, 2006), com 47,6% dos casos (JUNIOR, 2018). Em área urbana e endêmica, os cães são considerados os principais reservatórios devido a sua susceptibilidade ao agente e ao alto parasitismo cutâneo (DANTAS-TORRES, 2007), e pela atração do vetor por compostos aldeídos e alcanos no pelo dos cães infectados (MAGALHAES JUNIOR, 2015). Sendo assim, o diagnóstico na espécie canina pode servir de indicador para o surgimento de novos casos humanos, uma vez que a infecção canina precede a doença no homem (OLIVEIRA et al., 2001)

Nos cães a infecção por *L. infantum* tem sido considerada uma doença imunomediada (FEITOSA et al., 2000), onde os animais podem apresentar-se assintomáticos, ou exibir sinais inespecíficos como dermatopatias (SARIDOMICHELAKIS e KOUTINAS, 2014), onicogribose, apatia, anorexia, diarreia, hemorragia, poliartrite e linfadenomegalia (SOLANO-GALEGO et al., 2011; SANTANA, 2017; SILVA et al., 2017).

Os parâmetros laboratoriais relacionados a hematopoiese, função renal e eletroforese de proteínas sérica devem ser usados na rotina clínica como ferramentas no acompanhamento da doença (REIS et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). É

sabido que altas cargas parasitárias nos componentes do sistema fagocítico mononuclear (SFM), como por exemplo, medula óssea e fígado, desencadeia a ocorrência de patologias às funções hematopoiéticas e hepáticas (FREITAS et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013; LEAL et al., 2014; RIBEIRO et al., 2018). Dessa forma, as alterações nas linhagens celulares na medula óssea sugerem que o parasitismo exerce efeito negativo na hematopoiese (TROPIA DE ABREU et al., 2011; LAFUSE et al., 2013; ALMEIDA, 2017).

Com base nos mecanismos envolvidos nas alterações hematológicas na LVC, sabe-se que parte deles estão relacionados ao comprometimento da medula óssea que é observado por alterações no mielograma (MOMO et al., 2014; NICOLATO et al., 2013). Nesse contexto, considerando que a LV pode provocar alterações nos exames laboratoriais e pouco se conhece sobre as alterações que ocorrem na medula óssea após tratamento, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da terapia neste órgão por meio do mielograma e da carga parasitária, além de observar a resposta clínica de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a tratamento experimental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica causada por protozoários da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, que possui como principais espécies a *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* (JAIN e JAIN, 2015) e *Leishmania major* (KARAMI et al., 2007). É considerada uma das zoonoses emergentes mais importante do mundo (RIBEIRO et al., 2018), atingindo de 2 a 4 milhões de pessoas (WHO, 2007; AL-SALEM; HERRICKS; HOTEZ, 2016).

Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a LV como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) devido à ausência de atenção concedida pela indústria farmacêutica, resultando em taxas elevadas de mortalidade em populações menos favorecidas ao redor do mundo (POSTIGO, 2010). Nas Américas, a LV é endêmica em 12 países, onde no período de 2001-2017 foram registrados 59.769 casos novos, sendo cerca de 96% (57.582) deles reportados no Brasil (OMS, 2019).

Acredita-se que no Brasil, 43% da população está em risco de desenvolver a doença (WHO, 2016), e casos de LV já foram registrados em 23 unidades federativas sendo a maioria concentrada na região Nordeste do país (JUNIOR, 2018). Os cães possuem grande importância epidemiológica no ciclo da LV sendo considerado o principal reservatório urbano do parasito (WERNECK, 2014).

2.2 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Em áreas endêmicas, a LVC tem prevalência variável podendo ser observadas positivities de 4,9 a 67%. Esta ampla variação pode estar relacionada a inúmeros fatores, dentre eles o método diagnóstico utilizado (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; FRANÇA-SILVA et al., 2003; MONTEIRO et al., 2005; COURA-VITAL et al., 2011; LOPES et al., 2014).

A expansão da LVC no Brasil pode ser justificada através da associação de diversos fatores, como: industrialização e urbanização, que levam à destruição de ambientes naturais devido ao desmatamento, precariedade do saneamento básico e

medidas de controle de vetores e doenças ineficazes (RANGEL e VILELA, 2008; FERNANDÉZ et al., 2010; PAIVA et al., 2010; ROMERO e BOELAERT, 2010; HARHAY et al., 2011; ARAÚJO et al., 2013; SALOMÓN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; MARCONDES e DAY, 2019).

Existem altas taxas de infecção em cães no Brasil, tendo uma relação direta entre a alta prevalência de infecção canina com um alto risco de doença humana (BANETH et al., 2008, BRASIL, 2006). Desde a década de 30 casos de LVC têm sido descrito no Brasil (DEANE, 1956), e desde então a doença expandiu-se em todas as regiões brasileiras (GRILL e ZURMENDI, 2017; WHO 2017).

Muitos estudos demonstraram que os sinais clínicos e laboratoriais de cães infectados estão relacionados com a evolução da doença e interação entre o parasito e a resposta imune de cada hospedeiro (FOGLIA-MANZILLO et al., 2013, BELO et al., 2013). Cães infectados podem apresentar diferentes características clínicas, variando de assintomáticos a sintomáticos, com sinais clínicos incluindo linfadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas, alopecia, apatia, vômitos, diarreia, poliúria, polidipsia, esplenomegalia e palidez de mucosas (MANCIANTI et al., 1988; REIS et al., 2006; SILVA et al., 2017; TRAVI et al., 2018).

2.2.1 Transmissão e ciclo biológico

A transmissão do parasito ocorre principalmente pela picada de fêmeas de insetos hematófagos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (REITHINGER et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2017; VAN GRIENSVEN e DIRO, 2012; RIBEIRO et al., 2018). A espécie *Lutzomyia longipalpis* é a principal responsável pela transmissão, mas outras espécies como *Lutzomyia cruzi* (LAINSON; RANGEL, 2005) podem estar envolvidas na cadeia epidemiológica.

Ao fazer o repasto sanguíneo em seus hospedeiros, flebotomíneos infectados regurgitam formas promastigotas de *Leishmania* spp na pele, que invadem os tecidos ou são fagocitadas por células hospedeiras locais, principalmente macrófagos. A partir daí, formas promastigotas se transformam em formas amastigotas, que infectam outras células do sistema fagocítico mononuclear, sendo transmitidas a outros flebotomíneos

não infectados por ocasião do repasto sanguíneo (VANNIER-SANTOS; MARTINNY; DE SOUZA, 2002; ROGERS et al., 2004).

Além desta forma, estudos indicam que a transmissão da LVC pode ocorrer de forma vertical, onde mães infectadas transmitiriam a doença para seus filhotes (TOEPP et al., 2019), através de transfusão sanguínea (OWENS et al., 2001; DE FREITAS et al., 2006) e pela via venérea (SILVA et al., 2009).

2.2.2 Resposta Imune na LVC

O curso da infecção por *L. infantum* em cães depende da resposta imune do hospedeiro, e da persistência e multiplicação do parasito (COSTA-PEREIRA et al., 2015). Os neutrófilos são as primeiras células de defesa envolvidas no curso da infecção, sendo recrutados para o local da picada do flebotomíneo. Estudos *in vitro* demonstraram que os neutrófilos, quando estimulados com antígenos de *L. infantum*, são capazes de produzir altos níveis de IFN- γ na tentativa de diminuir a carga parasitária, além da redução na síntese de IL-4, inibindo assim a proliferação e diferenciação de células B (LEAL et al., 2014).

Para o estabelecimento de uma resposta imune protetora, é necessário que as células da resposta imune inata (principalmente macrófagos e células dendríticas) apresentem antígenos parasitários aos linfócitos T (MOMO et al., 2013), que secretam IFN- γ e induzem o macrófago a produzir TNF- α e óxido nítrico (NO), para destruição das formas amastigotas intracelulares (BARBIERI, 2006).

Durante a fase ativa da doença, o parasito se multiplica dentro das células do sistema fagocitário mononuclear presentes no baço, fígado e de medula óssea (GOTO; PRIANTI, 2009). O passo fundamental na geração de imunidade é a manutenção da proporção de células T CD4+ e T CD8+, e a produção das interleucinas IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF, promovendo o controle da infecção (SILVA, 2017).

O parasitismo presente na medula óssea pode interferir com a produção celular, provocando displasia e refletindo diretamente nos demais órgãos linfoides (CAR, 2010; MANZILLO et al., 2006; VALDEZ et al., 2012). Manzillo et al. (2006) referem que as

alterações da medula óssea são provocadas pela grande concentração de citocinas, como TNF- α e IFN- γ , produzidas pela infiltração de macrófagos.

2.3 Medula óssea e células hematopoiéticas

A medula óssea é o maior órgão hematopoiético em mamíferos, sendo composto de aproximadamente 2% do peso corporal em cães (JAIN, 1986) Histologicamente a medula óssea é dividida em vermelha e amarela. A vermelha é composta por células hematopoiéticas e pela estrutura de sustentação, que consiste em células reticulares, mesenquimais, endoteliais, neurais e matriz extracelular, localizadas fora do espaço vascular (SHARKEY, 2010). A medula óssea amarela é constituída por células mesenquimais que acumulam lipídios que gradualmente substituem o tecido hematopoiético (GUREVITCH et al., 2009), e pode transformar-se em medula vermelha durante processos patológicos capazes de estimular a eritropoiese (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Na avaliação microscópica, os aspirados de medula óssea contêm precursores das células hematopoiéticas, vasos, células reticulares, macrófagos e plasmócitos, que estão presentes nos compartimentos de proliferação e de maturação (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Os megacariócitos são células grandes, poliploides, com lobulação nuclear e citoplasma claro e abundante, sendo capazes de produzir milhares de plaquetas através da segmentação citoplasmática (SCHALM'S, 2010). Estima-se que 1000 a 3000 plaquetas sejam produzidas a partir de cada megacariócito, dependendo do seu tamanho (HARVEY, 2012).

Eritrócitos provêm da diferenciação da Unidade Formadora de Blastos – eritróide (BFU-E), dando origem aos progenitores eritróides. Diversas citocinas atuam sinergicamente com a eritropoietina (Epo) para estimular a replicação e diferenciação da linhagem de células vermelhas (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Os sinusoides e a polpa vermelha do baço são um compartimento de reserva repleto de eritrócitos, possuindo também macrófagos adjacentes responsáveis por remover os eritrócitos lesados ou menos deformáveis da circulação (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Em relação a linhagem mieloide, a medula óssea contém precursores para neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos e macrófagos. Uma célula tronco pluripotencial pode dar origem a uma célula tronco linfoide ou a uma unidade formadora de colônia – granulócito, eritrócito, monócito, megacariócito (CFU-GEMM) (STOCKHAM e SCOTT, 2011) (Figura 1). Os granulócitos realizam suas funções em defesa do hospedeiro e morrem, ao contrário dos linfócitos, que podem sofrer blastogênese, retornar ao sangue pelos vasos linfáticos ou morrer (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Linfócitos são as células responsáveis por formar a imunidade celular e humoral e na medula óssea são visualizados de forma semelhante ao sangue periférico, sendo divididos em linfócitos T, linfócitos B e células NK (Natural Killer). Linfócitos T são responsáveis pela imunidade celular, linfócitos B pela imunidade humoral, e as células NK são capazes de destruir as células estranhas ao organismo, como células tumorais, infectadas por vírus, com anticorpos em sua superfície, além de recrutar e ativar outras células hematopoiéticas em locais de inflamação (HARVEY, 2012).

Monócitos e neutrófilos compartilham da mesma célula tronco bipotencial (CFU-GM) (Figura 1), que se diferencia quando estimulada por citocinas inflamatórias. Monócitos e suas células progenitoras (monoblastos e promonócitos) possuem três principais funções: fagocitose, apresentação de antígenos aos linfócitos T e imunomodulação, devido a produção de diversas citocinas envolvidas na regulação da inflamação e hematopoiese (HARVEY, 2012). Os monócitos migram para o tecido e dependendo do local ou processo inflamatório instalado, os macrófagos se diferenciam em uma variedade de subtipos, adquirindo funções especializadas (SCHALM'S, 2010).

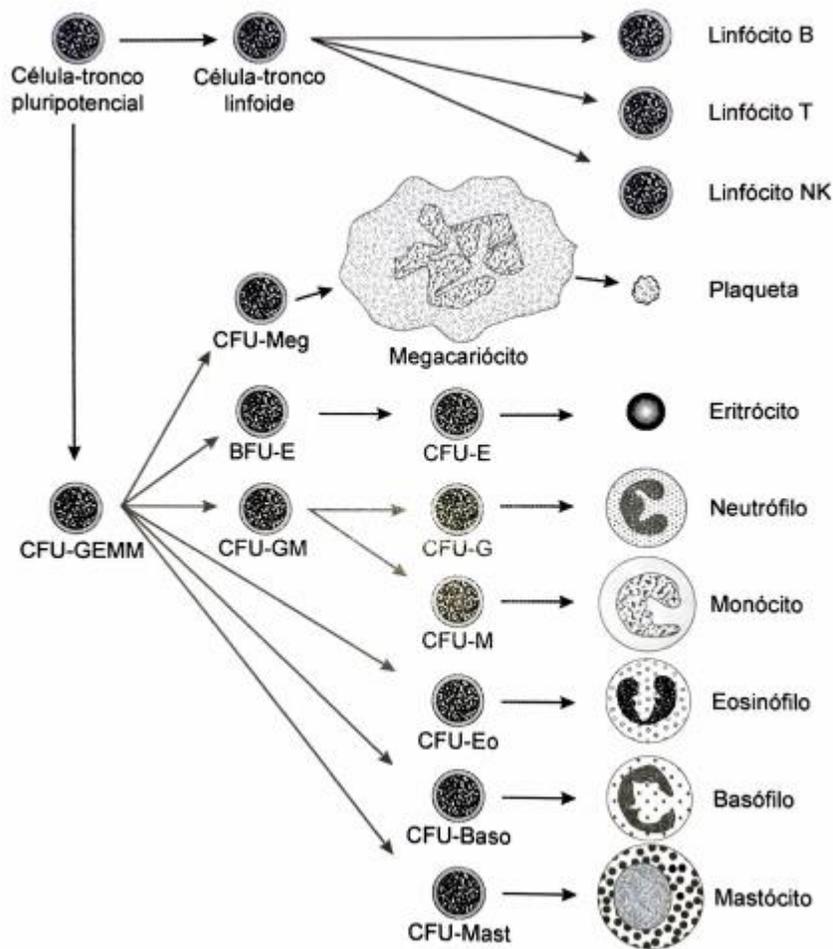


Figura 1. Diferenciação de células-tronco pluripotenciais em linhagens celulares comprometidas do sistema hematopoiético. CFU-GEMM, unidade formadora de colônia – granulócito, eritrócito, monócito, megacariócito; CFU-Meg, unidade formadora de colônia – megacariócito; BFU-E, unidade formadora de blastos – eritróide; CFU-GM, unidade formadora de colônia – granulócito/macrófago, CFU-E, unidade formadora de colônia – eritróide; CFU-G, unidade formadora de colônia – granulócito; CFU-M, unidade formadora de colônia – monócito; CFU-Eo, unidade formadora de colônia – eosinófilo; CFU-Baso, unidade formadora de colônia – basófilo; CFU-Mast, unidade formadora de colônia – mastócito; Linfócito NK, linfócito destruidor natural (Fonte: STOCKHAM e SCOTT, 2011).

A punção aspirativa da medula óssea permite a avaliação das características citológicas minuciosas das células hematopoiéticas, admitindo um estudo citológico completo através do mielograma (ALVES, 2009). Apesar de a medula óssea estar sempre em renovação (LEE et al., 2017), muitos estudos mostraram que infecções ou inflamações sistêmicas podem resultar em mudanças marcantes nas suas populações

celulares (ZARETSKY et al., 2012; ZARETSKY et al., 2014), apesar de serem poucos os relatos de LVC alterando a medula óssea (MOMO et al., 2014; PAOLA et al., 2016).

O mielograma é indicado quando são detectadas anormalidades no sangue periférico como neutropenia persistente, trombocitopenia inexplicada, anemia não regenerativa, alterações proliferativas como leucocitose e trombocitose, morfologia anormal das células ou presença de células imaturas no sangue, além de condições neoplásicas, avaliação do estoque de ferro e busca de doenças (ALENCAR et al., 2002; STOCKHAM e SCOTT, 2011; HARVEY, 2012). As contraindicações são poucas, como nos casos de pacientes com diásteses hemorrágicas (que pode levar a hemorragia pós coleta) e riscos de infecções no local da punção, raro quando se utiliza técnica adequada de colheita (ALENCAR et al., 2002)

É um exame de baixo custo pois utiliza pouco material, rápido e pouco invasivo. Anestesia ou sedação do paciente somente é realizada nos casos em que a contenção manual não é efetiva e em animais agressivos (HARVEY, 2012).

2.3.1 Alterações na medula óssea associadas à LVC

A medula óssea é o principal órgão hematopoiético e um tecido linfoide primário, além de ser considerado um importante local de proliferação de *Leishmania* sp. (TROPIA DE ABREU et al., 2011). Embora muitos estudos demonstrem que há alterações na composição celular associadas à medula óssea em cães com LV (MOMO et al., 2014; YIZENGAW et al., 2016), ainda são poucos os trabalhos relacionados ao mecanismo patogênico nesse órgão (PINHO, 2014). Entre as alterações patológicas mais comuns na medula óssea de animais diagnosticados com LVC, estão as alterações nas linhagens de megacariócitos, (FOGLIA-MANZILLO et al., 2006; MOMO et al., 2014) e alterações nas produções de leucócitos e hemácias (TRÓPIA DE ABREU et al., 2011).

Estudando a LVC associada à evolução do estado clínico, pesquisadores observaram que o mielograma de cães sintomáticos estava intimamente relacionado a contagem de células absolutas no sangue periférico, sugerindo que os distúrbios na mielopoiese estão diretamente associados as contagens de eritrócitos e leucócitos circulantes, resultando em consequências como anemia e leucopenia (eosinopenia,

monocitopenia e linfopenia) típicas em cães com doenças graves. Além disso, a LVC causa alterações nas linhagens de células eritropoiéticas (especialmente rubriblastos basofílicos e rubriblastos ortocromáticos), com sua consequente diminuição de acordo com o progresso clínico da LVC, em contraste com o aumento de precursores neutrofílicos e neutrófilos segmentados, linfocitose e redução de precursores eosinofílicos (NICOLATO et al., 2013).

Em estudo realizado por De Tommasi e colaboradores (2014), foi possível observar supressão da série eritróide, infiltração da medula óssea por linfócitos e plasmócitos e a presença de mitoses atípicas em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Hipoplasia eritróide e eosinofílica, proliferação de precursores de neutrófilos e aumento significativo de linfócitos e macrófagos também já foram relatadas (ABREU et al., 2011; NICOLATO et al., 2013).

Embora alguns trabalhos demonstrem alterações quantitativas e qualitativas no mielograma em cães com infecção natural por *Leishmania infantum*, raros estudos relatam as alterações na gênese celular na medula envolvida nesses processos, mostrando assim a necessidade de estudos mais detalhados para elucidar a interferência do parasito na hematopoiese.

2.4 Diagnóstico da LVC

O diagnóstico da LVC é extremamente complexo, devido à variedade de sinais clínicos inespecíficos e ao grande número de animais assintomáticos. Na maioria dos casos, é necessária uma abordagem integrada, considerando sinais clínicos, histórico, procedência e uma combinação de testes diagnósticos para confirmação ou exclusão da suspeita clínica (PAPARCONI et al., 2013).

2.4.1. Diagnóstico parasitológico

O exame padrão-ouro é baseado na identificação de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em amostras de medula óssea, linfonodo e/ou baço (SUNDAR, 2002), além da citologia esfoliativa e suabe ocular que também tem se mostrado sensíveis na

detecção do parasito (BARBOSA et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2004). São técnicas com a vantagem de serem minimamente invasivas., além de serem métodos seguro e de fácil execução (PAPARCONE et al., 2013). O exame parasitológico direto é altamente específico, podendo chegar a 100%, entretanto a sensibilidade é variável, uma vez que a distribuição tecidual não é homogênea (FARIA e ANDRADE, 2012).

Outra técnica utilizada é a imuno-histoquímica, sendo altamente sensível e específica para a detecção de formas amastigotas em tecidos como pele, fígado e órgãos linfoides (LAURENTI, 2009). A cultura e inoculação em animais de laboratório também é um método de diagnóstico parasitológico, embora não seja muito utilizada já que são necessárias várias semanas até se verificar positividade na inoculação (QUEIROZ, 2008).

2.4.2. Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos são mais utilizados para realização de levantamentos epidemiológicos pela vantagem de serem métodos práticos, menos onerosos e rápidos (TAVORA et al., 2007), porém eles devem ser usados e interpretados com cautela pois podem gerar resultados falsos positivos devido a possibilidade de reação cruzada com outros patógenos, como por exemplo parasitos do gênero *Trypanosoma* e outras espécies de *Leishmania* (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Os métodos sorológicos são baseados na detecção de anticorpos específicos (IgG), sendo os mais utilizados a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) e o ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) (SOLANO-GALLEGO, 2011).

No Brasil, o exame de triagem recomendado pelo Ministério da Saúde é o Dual Path Platform (DPP®) – BioManguinhos/ Fundação Oswaldo Cruz, um teste rápido imunocromatográfico que utiliza a proteína recombinante K39 como antígeno. Por ser um teste de triagem, permite que apenas os animais positivos sejam encaminhados para testes confirmatórios. Para confirmação, é preconizado pelo Ministério da Saúde o ELISA, que apresenta sensibilidade de 100% e especificidade entre 96 a 100% (METTLER et al., 2005).

2.4.3. Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular, método baseado na identificação do DNA do parasito através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), é muito utilizado para o diagnóstico da doença em cães assintomático ou ainda em cães recém infectados, já que na maioria dos casos esses animais não apresentam soro conversão (SOLCA, 2012). Esse método tem como vantagem uma sensibilidade e especificidade próximas a 100% de acordo com a amostra utilizada (NASCIMENTO 2015), além da vantagem de poder utilizar diferentes materiais biológicos (FARIA & ANDRADE, 2012).

A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa (qPCR), permite quantificar a amplificação do produto da reação, utilizando corantes ou sondas fluorescentes (SOLCA, 2012). Essa variação da técnica é amplamente utilizada para monitoramento dos níveis de parasitismo em animais submetidos a tratamento (QUARESMA, 2007).

Outra modificação da técnica de PCR é a LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification - Amplificação isotérmica mediada por loop) que utiliza três pares de primers que se ligam em oito regiões distintas do DNA alvo, o que torna a reação altamente específica (GONÇALVES, 2014; ABBASI et al., 2016) e permite o rápido diagnóstico da doença (SRIWORARAT et al., 2015).

2.5 Tratamento da LVC

O tratamento da LVC é um desafio para o médico veterinário devido a complexidade da doença, o envolvimento sistêmico e cutâneo e a condição clínica geral do paciente. Diferentes protocolos de tratamento vêm sendo utilizados em cães com LV, a maioria já estabelecidos nos países europeus (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Os principais fármacos utilizados são os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B convencional ou encapsulada em lipossomas, o sulfato de aminosidina, o alopurinol, a pentamidina e miltefosine (NOLI; AUXILIA, 2005; REGUERA et al., 2016).

Os antimoniais pentavalentes são usados desde os anos 1940 no tratamento das leishmanioses cutânea e visceral em humanos (TIUMAN et al., 2011). É um sal de

antimônio, que é o elemento que age sobre a leishmania, inibindo seu metabolismo, tendo ação leishmanicida (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Embora a terapia combinada de antimoniato de meglumina e alopurinol seja a primeira opção de protocolo terapêutico em cães na Europa, o uso de N-metil-glucamina é proibido no Brasil devido a Portaria Interministerial Nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Dessa maneira, em 2016, foi autorizado o uso do Milteforan (VIRBAC SAÚDE ANIMAL), para o tratamento da leishmaniose visceral em cães, a partir da assinatura da nota técnica conjunta nº 001/2016 MAPA/MS pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Ministério da Saúde (MS).

Embora seu mecanismo de ação não esteja totalmente esclarecido, estudos mostram que a miltefosina é capaz de estimular células T elevando os níveis de IFN- γ , estimulando assim a produção de óxido nítrico e radicais reativos de oxigênio dentro dos vacúolos dos macrófagos, eliminando os parasitos (MANNA et al., 2009; REGUERA et al., 2016). Quando usado como monoterapia reduz consideravelmente a carga parasitária, porém estudos demonstram que não ocorre eliminação completa do parasito (MANNÁ et al., 2008; ANDRADE et al., 2011). Dessa forma, é recomendável a associação com outros fármacos, como o alopurinol, protocolo que tem mostrado boa efetividade (MANNA et al., 2015; REGUERA et al., 2016).

O alopurinol é uma droga leishmanioestática, atuando como um análogo de purina e inibindo síntese proteica quando incorporada ao RNA do parasito (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014). Como terapia associada com uma droga leishmanicida, representa o composto mais usado contra o LVC na Europa (MATTIN et al., 2014), induzindo remissão dos sinais clínicos e baixa toxicidade (RIBEIRO, 2008).

Protocolos terapêuticos associando fármacos leishmanioestáticos e imunoestimulantes também vem sendo muito utilizados. Apesar de uma droga humana, há literatura técnica que baseia o uso da domperidona na medicina veterinária (OCHOA, 2014). Essa droga é um antagonista do receptor de dopamina e provoca a liberação de serotonina, estimulando produção de prolactina e produção de linfócitos Th1 e de IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α , levando à ativação dos macrófagos seguida da diminuição da população de Th2 (GOMEZ-OCHOA et al., 2009).

Estudos demonstram que a administração de domperidona em cães saudáveis consegue estimular a hematopoiese e a atividade leucocitária, e que a utilização em cães com leishmaniose é capaz de frear a evolução da doença e melhorar os sintomas clínicos (OCHOA, 2014).

Dados recentes indicam que a resistência aos antimoniais tem se tornado um problema na Índia e no Sudão. Estudos demonstraram resistência ao alopurinol associado a recidiva de doença clínica (YASUR-LANDAU et al., 2016). O uso de antimoniais usados no tratamento da doença em humanos para o tratamento da doença em cães, prática comum nos países da Região Mediterrânea, é um gatilho para o desenvolvimento da resistência do parasito ao fármaco (GRAMICCIA et al., 1992).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o mielograma e a carga parasitária em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* submetidos a tratamento experimental.

3.2 Específicos

- Avaliar as alterações da medula óssea por meio do mielograma em cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. no dia zero e 30 dias após o tratamento experimental.
- Detectar a persistência de formas amastigotas de *Leishmania* sp. na medula óssea após 30 dias de tratamento.
- Verificar a associação entre a manifestação clínica e a carga parasitária na medula óssea no dia zero e após 30 dias de tratamento.
- Determinar a carga parasitária por meio da PCR em tempo real em amostras de medula óssea do dia zero e 30 dias após tratamento.

REFERÊNCIAS

ABASSI, I.; KIRSTEIN, O. D.; HAILU, A.; WARBURG, A. Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of *Leishmania* DNA in human blood samples. **Acta Tropica**, v. 162, p. 20-26, 2016.

ABREU, R. T.; CARVALHO, M. G.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; COURA-VITAL, W.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B.; Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PLOS One**, v. 6. p. 1-9, 2011.

ALENCAR, X. N.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K. C. H.; TAKAHIRA, R. K. Mielograma. Parte I: indicações e colheita do material. **Revista de Educação Continuada**, v. 5, p. 157-163, 2002.

AL-SALEM, W.; HERRICKS, J.R.; HOTEZ, P.J. A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. **Parasites & Vectors**, v.9, n.1, p.1-11, 2016.

ALMEIDA, V. A. Alterações na medula óssea e distúrbios hematológicos na leishmaniose visceral canina. 101. 2017. **Tese** (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, 2017.

ALVES, A.C. Histologia da medula óssea. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.3, p.183-188, 2009.

ANDRADE, H. M.; TOLEDO, V. P. C. P.; PINHEIRO, M. B.; GUIMARAES, T. M. P. D.; OLIVEIRA, N. C.; CASTRO, J. A.; SILVA, R. N.; AMORIM, A. C.; BRANDAO, R. M. S. S.; YOKO, M.; SILVA, A. S.; DUMONT, K.; RIBEIRO, M. L.; BARTCHEWSKY, W.; MONTE, S. J. H. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 83-90, 2011.

ARAÚJO, V.E.M.; PINHEIRO, L.C.; ALMEIRA, M.C.M.; MENEZES, F.C.; MORAIS, M.H.F.; REIS, I.A.; ASSUNÇÃO, R.M.; CARNEIRO, M. 2013. Relative Risk of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Spatial Analysis in Urban Area. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.11, 2013.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 324-330, 2008.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v.28, p.329-337, 2006.

BARBOSA, V. T.; SILVA, M. A. G.; SOUSA, M. G.; GERING, A. P.; SANTOS, H. D.; LAUS, J. L. Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e zootecnia**, v. 64, p. 1465-1470, 2012.

BELO, V.S.; WERNECK, G.L.; BARBOSA, D.S.; SIMÕES, T.C.; NASCIMENTO, B.W.L.; SILVA, E.D.; STRUCHINER, C.J. Factors associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.4, p.1-11, 2013.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, n.3, p.273-277, 1996.

Brasil, 2006. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, Brasília, 120p.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Seminar**, p- 1-20, 2018.

CAR, B.D. The hematopoietic system. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Shalm's veterinary hematology**. Wiley Blackwell, Iowa. Cap 5. 6th ed, p.27-35, 2010.

CAVALCANTI, M. P.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C.; BORBA, M. A. .C; SILVA, L. B. G.; MOTA, R. A. Infecções micóticas e bacterianas em lesões cutâneas de cães parasitologicamente positivos para *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, p. 160-162, 2004.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H. F.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 1-10, 2011.

DANTAS-TORRES, F. Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de paulista, estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. 96f. 2006. **Dissertação** (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Recife- PE, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2007.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil**. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, 161p., 1956.

DE FREITAS, E.; MELO, M.N.; DA COSTA-VAL, A.P.; MICHALICK, M.S. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, 137(1-2), p. 159-167, 2006.

DE OLIVEIRA, E.F.; OSHIRO, E.T.; FERNANDES, W.S.; FERREIRA, A.M.; DE OLIVEIRA, A.G.; GALATI, E.A. Vector Competence of *Lutzomyia cruzi* Naturally Demonstrated for *Leishmania infantum* and Suspected for *Leishmania amazonensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 178–181, 2017.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, p. 47-57, 2012.

FEITOSA M.M., IKEDA F.A., LUVIZOTTO M.V.R. & PERRI S.H.V. 2000. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, ano 5, n 28, p. 36-44, 2000.

FERNÁNDEZ, M.S.; SALOMÓN, O.D.; CAVIA, R.; PEREZ, A.A.; ACARDI, S.A.; GUCCIONE, J.D. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with

environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. **Acta Tropica**, v.114, p.81-87, 2010.

FOGLIA-MANZILLO, V.; RESTUCCI, B.; PAGANO, A.; GRADONI, L.; OLIVA, G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Record**, v.158, n.20, p.690–694, 2006.

FOGLIA-MANZILLO, V.; DI MUCCIO, T.; CAPPIELLO, S.; SCALONE, A.; PAPANICOLAOU, R.; FIORENTINO, E.; GIZZARELLI, M.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; OLIVA, G. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7 n.5, 2013.

FRANCA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.; DA COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p.161–173, 2003.

FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; NETO, B. E. L.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 24-29, 2012.

GOLÇALVES, D. S. Detecção da bactéria Wolbachia em insetos através da técnica LAMP (amplificação isotérmica mediada por *loop*). 78f. 2014. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte – MG, 2014.

GOTO, H. PRIANTI, M. G. Review immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 241-246, 2009.

GRILL, F.; ZURMENDI, M. Leishmaniasis visceral en Uruguay. **Archivos Pediatría de Uruguay**, v.88, p.32-38, 2017.

GUREVITCH, O.; SLAVIN, S.; RESNICK, I.; KHITRIN, S.; FELDMAN, A. Mesenchymal progenitor cells in red and yellow bone marrow. **Folia Biologica**, v.55, p.27-34, 2009.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.2011. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v.27, p.403-409, 2011.

HARVEY, J. W. Veterinary Hematology. A diagnostic guide and color atlas. St. Louis, Missouri: **Elsevier**, 2012.

JAIN, N.C. **The dog: normal hematology with comments on response to disease.** In Schalm's Veterinary Hematology. 4a ed. Philadelphia (PA): Lea and Febiger, 1986.

JAIN, K.; JAIN, N.K. Vaccines for visceral leishmaniasis: a review. **Journal of Immunological Methods**, v.422, p.1-12, 2015.

JUNIOR, J. T. M. Aspectos vetoriais da *Lutzomyia longipalpis*: resposta comportamental a compostos orgânicos voláteis e uso na avaliação de infectividade de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. 101f. 2015. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, 2015.

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

KARAMI, M.; MOTAZEDIAN, M. H.; MEHRABANI, D.; GHOLAMI, K. Leishmania major infection in a patient with visceral leishmaniasis: treatment with Amphotericin B. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1431-1434, 2007.

KASHIF, M.; MANNA, P.P.; AKHTER, Y.; ALAIDAROUS, M.; RUB, A. Screening of novel inhibitors against *Leishmania donovani* calcium ion channel to fight Leishmaniasis. **Infectious Disorders Drug Targets**, v.17, n.2, p.120-129, 2017.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAFUSE, W. P.; STORY, R.; MAHYLIS, J.; GUPTA, G.; VARIKUTI S.; STEINKAMP H.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R.; *Leishmania donovani* infection induces anemia in hamsters by differentially altering erythropoiesis in bone marrow and spleen. **Plos One**, v. 8, p. 1-12, 2013.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 67, p. 13-23, 2009.

LEAL, G. G. A.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; FRANCISCO, A. F.; CARDOSO, J. M.; MATHIAS, F. A. S.; CORREA-OLIVEIRA, R. CARNEIRO, M. COURA-VITAL, W. REIS, A. B. Immunological profile of resistance and susceptibility innaturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 472-482, 2014.

LEE, Y.; DECKER, M.; LEE, H.; DING, L. Extrinsic regulation of hematopoietic stem cells in development homeostasis and diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology**, v.6, n.5, p.1-29, 2017.

LOPES, P. M.; SORTE, E. C. B.; GASPARETTO, N. D.; OLIVEIRA, C. M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F. Seroprevalence and risk factors associated with visceral leishmaniasis in dogs in Jaciara, State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 791-795, 2014.

MANNA, et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Journal**, v.182, p. 441–445, 2009.

MANNA, L.; CORSO, R.; GALIERO, G.; CERRONE, A.; MUZJ, P.; GRAVINO, A. E. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 289, 2015.

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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, n.4, p.566–567, 1988.

MANZILLO, V.F.; RESTUCCI, B.; PAGANO, A.; GRADONI, L.; OLIVA, G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Record**, v.158, p.690-694, 2006.

MARCONDES, M.; DAY, M.J. Current Status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v.123, p.261-272, 2019.

MARCONDES, M.; BIONDO, A.W.; GOMES, A.A.D.; SILVA, A.R.S.; VIEIRA, R.F.C.; CAMACHO, A.A.; QUINN, J.; CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.175, p.15-19, 2011.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. **Journal of clinical microbiology**, p. 5515-5519, 2005.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v.24, p.371-377, 2008.

Ministério da Saúde.Fundação Nacional de Saúde.Centro Nacional de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. **Boletim Epidemiológico**, v. 6, p.1-11, 2001.

MOMO, C. Resposta imune na medula óssea e perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral. 89f. 2013. **Tese** (Doutor em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2013.

MOMO, C.; JACINTHO, A.P.P.; MOREIRA, P.R.R.; MUNARI, D.P.; MACHADO, G.F.; VASCONCELOS, R.O. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with Visceral Leishmaniasis. **Veterinary Medicine International**, v.2014, p.1-5, 2014.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S.; Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em

Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 147-152, 2005.

NASCIMENTO, G. G. Avaliação da carga parasitária em cães com infecção natural *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, submetidos a tratamento experimental. 88f. 2015. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 2015.

NICOLATO, R.C., TRÓPIA-DE-ABREU, R.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; REIS, L.E.S.; CARVALHO, M.G.; CARNEIRO, C.M.; GIUNCHETTI, R.C.; BOUILLET, L.E.M.; LEMOS, D.S.; COURA-VITAL, W.; REIS, A.B. 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. **Veterinary Dermatology**, 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*). **Veterinary Journal**, v. 202, p. 425-435, 2014.

OCHOA, P. G. Estudio de un nuevo tratamiento de la leishmaniosis canina. Valoración del efecto inmunomodulador de la domperidona. 88f. 2014. **Tese** (Doutorado em Patologia Animal) – Universidade de Zaragoza, Zaragoza-Espanha, 2014.

OLIVEIRA, A.M.; VIEIRA, C.P.; DIBO, M.R.; GUIRADO, M.M.; RODAS, L.A.C.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. **Acta Tropica**, v.64, p. 233–242, 2016.

OLIVEIRA, C. L.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETTI, F. A.; Distribuição espacial da leishmaniose visceral humana e canina em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1994-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, p. 1231-1239, 2001.

OWENS, S.D.; OAKLEY, DA MARRYOTT. K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T.J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic

dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n 8, p.1076-1083, 2001.

PAOLA, S.; AVALOS, A.; MAIDANA, L. SUAREZ, M.; MARECOS, E.; OREGGIONI, G. Correlación de los cambios morfométricos en riñon y médula ósea en caninos infectados naturalmente con *Leishmania* sp. **Compendio de Ciências Veterinárias**, v.6, n.1, p.11-16, 2016.

PAPARCONI, R.; FIORENTINO, E.; CAPPIELLO, S.; GIZZARELLI, M.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; MANZILLO, V.F. Sternal aspiration of bone marrow in dogs: a practical approach for canine leishmaniasis diagnosis and monitoring. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2013, p.1-4, 2013.

PAIVA, B.R.; OLIVEIRA, A.G.; DORVA, M.E.M.C., GALATI, E.A.B; MALAFRONTI, R.S. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Tropica**, v.115, p.126–130, 2010.

PELLISSARI, D. M.; CHECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L.; JUNIOR, F. E. F. L.; Treatment of Visceral Leishmaniasis and American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, p. 107-110, 2011.

PINHO, F. A. Patogênese da pancitopenia na leishmaniose visceral canina e murina. 116f. 2014. **Tese** (Doutorado em Ciências) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2014.

PIGOTT, D. M.; BHATT, S.; GOLDIN, N.; DUDA, K. A.; BATTLE, K. E.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; BALARD, Y.; BASTIEN, P.; PRATLONG, F.; BROWNSTEIN, J. S.; FREIFELD, C. C.; MEKARU, S. R.; GETHING, P. W.; GEORGE, D. B.; MYERS, M. F.; REITHINGER, R. HAY, S. I. Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLife**, v. 3, p. 1-21, 2014.

POSTIGO, A.R. Leishmaniasis in the world health organization eastern mediterranean region. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.36, n.1, p.62–65, 2010.

QUARESMA, P. F. Diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina e quantificação da carga parasitária através da reação em cadeia da polimerase. 121f.

2007. **Dissertação** (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fiocruz, Belo Horizonte – MG, 2007.

QUEIROZ, M. N. G. P. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a rifi e elisa-teste. 127f. 2008. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba – SP, 2008.

RANGEL, E.F.; VILELA, M.L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2948–2952, 2008.

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

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 68-75, 2006.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.7, p. 581-596, 2007.

RIBEIRO, R. R.; MOURA, E. P.; PIMENTEL, V. M.; SAMPAIO, W. M.; SILVA, S. M.; SCHETTINI, D. A.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; TAFURI, W. L.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; FREZARD, F.; MICHALICK, M. S. M. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. 2564-2572, 2008.

RIBEIRO, R. R.; SILVA, S. M.; FULGENCIO, G. O.; MICHALICK, M. S. M.; FREZARD, F. J. G. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 373-378, 2013.

RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; SILVA, M. E.; SANTOS, C. C. P.; FREZARD, F. J. G.; SILVA, S. M. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, p. 1-12, 2018.

ROGERS, M.E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A.V.; FERGUSON, M.A.J.; BATES, P.A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v.430, p.463–467, 2004.

ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America - A Systematic Review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.1, 2010.

SALOMÓN, O.D.; FELICIANGELI, M.D.; QUINTANA, M.G.; AFONTOS, M.M.S.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, p.831–846, 2015.

SANTANA, M. A.; Estresse oxidativo em cães (*Canis familiaris*) Linnaeus, 1758, naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CUNHA E CHAGAS, 1937) SHAW, 2002, submetidos a tratamento experimental. 43f. 2017. **Dissertação** (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 2017.

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; KOUTINAS, A.F. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Veterinary Dermatology**, v. 25, p. 61-71, 2005.

SCHALM'S **Veterinary hematology**. 6. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. 1232p.

STOCKHAM, S. L., SCOTT, M. A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 729p.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE. Manejo terapêutico de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA). Santa Catarina, 2018.

SHARKEY, L.C.; HILL, S.A. **Structure of bone marrow**. 6a ed. Ames (IA): Blackwell Publishing Ltd; 2010.

SILVA, F.L.; OLIVEIRA, R.G.; SILVA, T.M.; XAVIER, M.N.; NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 55-59, 2009.

SILVA, J.P.; WERNECK, G.L.; MACEDO, E.C.; CARVALHO, H.; CRUZ, M.S.P. Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 480–484, 2012.

SILVA, L. A. M. T. Caracterização da resposta imune celular em cães frente a novos antígenos de *Leishmania infantum*. 86f. 2017. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife – PE, 2017.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using pcr on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v.4, 2011.

SOLCA, M. S. Uso de PCR no diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma abordagem comparativa de diferentes protocolos e tecidos. 94f. 2012. **Dissertação** (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, 2012.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, vol. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. C.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp. em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 482-483, 2007.

TRÓPIA-DE-ABREU, R., CARVALHO, M.G.; CARNEIRO, C.M.; Influence of Clinical Status and Parasite Load on Erythropoiesis and Leucopoiesis in Dogs Naturally Infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PLoS ONE**, v.6, n.5, p.1-11, 2011.

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRO, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. 1-13, 2018.

TOEPP, A.J.; BENNETT, C.; SCOTT, B.; SENESAC, R.; OLESON, J.J.; PETERSEN, C.A. Maternal *Leishmania infantum* infection status has significant impact on leishmaniasis in offspring. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.13, n. 2, p. 1-16, 2019.

TOLEZANO, J.E.; ULIANA, S.R.; TANIGUCHI, H.H.; ARAÚJO, M.F.; BARBOSA, J.A.; BARBOSA, J.E.; FLOETER-WINTER, L.M.; SHAW, J.J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.149, p. 280-284, 2007.

DE TOMMASI, A. S.; OTRANTO, D.; FURLANELLO, T.; TASCA, S.; CANTACESSI, C.; BREITSCHWERDT, E. B.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; BANETH, G.; CAPELLI, G.; CAPRARIIS, D. Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. **Parasites & Vectors**, v, 7. p. 1-10, 2014.

TRONCARELLI, M.Z.; CAMARGO J.B.; MACHADO, J.G.; LUCHEIS, S.B.; LANGONI, H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.164, p.118–123, 2009.

UFMG. **Saiba mais sobre tratamento de leishmaniose visceral canina**. Disponível em

https://vet.ufmg.br/noticias/exibir/3912/saiba_mais_sobre_tratamento_de_leishmaniose_visceral_canina. Acessado em 06/05/2019.

UMEZAWA, E.S.; SOUZA, A.I.; PINEDO-CANCINO, V.; MARCONDES, M.; MARCILI, A.; CAMARGO, L.M.A.; CAMACHO, A.A.; STOLF, A.M.S.; TEIXEIRA, M.M.G. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, v.111, p.15–20, 2009.

VANNIER-SANTOS, M.A.; MARTINY, A.; SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**, v.8, n.4, p.297-318, 2002.

VAN-GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v.26, n.2, p.309-322, 2012.

ZANETTE, M.F.; LIMA, V.M.F.L.; LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; VIDES, J.P.; VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; MARCONDES, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, 2014.

ZARETSKY, A.G.; ENGILES, J.B.; HUNTER, C.A. Infection-induced changes in hematopoiesis. **The Journal of Immunology**, v.192, p.27-33, 2014.

ZARETSKY, G.A.; SILVER, J.S.; SIWICKI, M.; DURHAM, A.; WARE, C.F.; HUNTER, C.A. Infection with *Toxoplasma gondii* alters lymphotoxin expression associated with changes in splenic architecture. **Infection and Immunity**, v.80, p. 3602-3610, 2012.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 851-855, 2014.

WHO. **Report of a WHO informal consultation on liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis**, Rome, Italy. 2007. 16p.

WHO. **Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Third Who Report on neglected Tropical Diseases**. World Health Organization, v.3, 2015.

WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en>. Acessado em 25 11 2017.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en>. Acessado em 31 03 2019.

YASUR-LANDAU, D.; JAFFE, C. L.; DAVID, L.; BANETH, G. Allopurinol resistance in *Leishmania infantum* from dogs with disease relapse. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1-6, 2016.

YIZENGAW, E.; GETAHUN, M.; TAJEBE, F.; CERVERA, E.C.; ADEM, E.; MESFIN, G.; HAILU, A.; DER AUWERA, G.V.; YARDLEY, V.; LEMMA, M.; SKHEDY, Z.; DIRO, E.; YESHANAW, A.; MELKAMU, R.; MENGESHA, B.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; MÜLLER, I.; TAKELE, Y.; KROPF, P. Visceral leishmaniasis patients display altered composition and maturity of neutrophils as well as impaired neutrophil effector functions. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1-12, 2016.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DO MIELOGRAMA EM CÃES (*Canis lupus familiaris*) NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS A TRATAMENTO EXPERIMENTAL COM DOMPERIDONA ASSOCIADA A ALOPURINOL

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) pode provocar diversas alterações na produção de células hematopoiéticas, que são vistas por meio do mielograma. O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações no mielograma de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e submetidos a tratamento experimental. Foram utilizados 10 cães adultos, de ambos os sexos, que foram tratados por 30 dias com a associação de alopurinol (10mg/kg/BID) e domperidona (1mg/kg/SID) foram utilizados no estudo. As punções de medula óssea foram realizadas no dia zero e 30 dias após o início do tratamento, onde foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro, fixadas e coradas para avaliação citológica. O mielograma dos animais revelou, no dia zero, redução no número de metarrubricitos, diminuição nos valores de promielócito, mielócito neutrofílicos, metamielócito neutrofílico e bastonete neutrofílicos, e aumento no número de neutrófilos e macrófagos, além de diminuição no número de megacariócitos. No dia 30 foi observado redução no número de metarrubricitos, prorrubricitos, promielócito, mielócito neutrofílicos, metamielócito neutrofílicos, bastonete neutrofílicos, e megacariócitos. Observou-se também aumento no número de neutrófilos, macrófagos e plasmócitos, além de aumento discreto na relação mieloide:eritróide. Com relação as alterações morfológicas, foi observado binucleação celular (2/10) e presença de mitoses atípicas (2/10). Leucofagocitose foi observada em 20% (2/10) dos animais. Em 70% dos animais, formas amastigotas de *Leishmania* sp. foram visualizadas após tratamento. Com esses resultados sugere-se que o mielograma não seja a melhor ferramenta para o acompanhamento de cães com LVC quando se objetiva avaliar a resposta do paciente num curto período de tratamento.

Palavras-chave: Mielograma. Células hematopoiéticas. Leishmaniose Visceral Canina.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) can cause several changes in the production of hematopoietic cells, which are seen through the myelogram. Thus, the objective of this study was to evaluate the changes in the myelogram of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and submitted to experimental treatment. For this, 10 adult dogs of both sexes were used and treated for 30 days with the combination of allopurinol (10mg/kg/BID) and domperidona (1mg/kg/SID). Bone marrow punctures were performed on day zero and 30 days after the start of treatment, where smears were made on glass slides, fixed and stained for cytological evaluation. The myelogram of the animals showed, on day zero, a reduction in the number of metarubricytes, a decrease in the values of promyelocytes, neutrophilic myelocytes, neutrophilic metamelocytes and neutrophilic band, and an increase in the number of neutrophils and macrophages, as well as a decrease in the number of megakaryocytes. At day 30, a reduction in the number of metarubricytes, prorubricytes, promyelocytes, neutrophilic myelocytes, neutrophilic metamielocytes, neutrophilic band, and megakaryocytes was observed. An increase in the number of neutrophils, macrophages and plasmocytes was observed, as well as a slight increase in the myeloid:erythroid ratio. Regarding morphological changes, cell binucleation (2/10) and presence of atypical mitoses (2/10) were observed. Leukophagocytosis was observed in 20% (2/10) of the animals. In 70% of the animals, amastigote forms of *Leishmania* sp. were visualized before and after treatment. With these results, it is suggested that the myelogram is not the best tool for monitoring dogs with CVL when the objective is to evaluate the patient's response in a short treatment period.

Key words: Myelogram. Hematopoietic cells. Canine Visceral Leishmaniasis.

1 Introdução

A leishmaniose visceral (LV), causada pela *Leishmania infantum*, é uma doença de caráter zoonótico e negligenciada em todo o mundo (POSTIGO, 2010). Em áreas endêmicas, os cães são a principal fonte de infecção para o vetor (WERNECK, 2014), sendo o *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie responsável pela transmissão do parasito no ambiente urbano no Brasil (LAINSON; RANGEL, 2005; DANTAS-TORRES et al., 2012).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) pode se manifestar com diversos sinais clínicos e diferentes graus de severidade (SOLANO-GALLEGO et al., 2011), como também pode se apresentar de forma assintomática (LOPES et al., 2014). Alterações nos parâmetros hematológicos também podem ser observadas, sendo os mais comuns anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia (ULCHAR, 2015), leucopenia, hiperproteinemia e hipergamaglobulinemia (REIS et al., 2006; FREITAS et al., 2012).

O diagnóstico da doença ainda é um desafio devido a existência de cães assintomáticos ou com sinais clínicos inespecíficos, e pela dificuldade de se obter um teste 100% sensível e específico (MOREIRA, et al., 2003). Muitas vezes o diagnóstico é alcançado pela combinação de diversos exames laboratoriais, sendo o diagnóstico definitivo baseado no isolamento do parasito *in vitro* ou na detecção de DNA de *Leishmania infantum* por meio de testes moleculares. (METTLER et al., 2005).

Diversos protocolos de tratamento vêm sendo estudados no controle da doença, uma vez que cães tratados apresentam redução da carga parasitária e, por consequência, redução da infectividade pelo flebotomíneo (RIBEIRO et al., 2008; MIRÓ et al., 2011; NERY et al., 2017). No Brasil, o tratamento autorizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério da Saúde (MS) é realizado com o fármaco Miltefosina. Porém, estudos já vem demonstrando que a monoterapia com essa droga não é recomendada em áreas endêmicas por não ser eficaz na redução da carga parasitária (ANDRADE et al., 2011).

Tendo como base que parte das alterações hematológicas estão ligadas ao comprometimento da medula óssea na LV, e que a presença do parasito neste órgão pode influenciar o processo de proliferação e diferenciação celular, o qual pode ser observado por meio do mielograma (NICOLATO et al., 2013), o objetivo deste trabalho

foi avaliar as alterações citológicas da medula óssea em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e submetidos a tratamento experimental.

2 Material e Métodos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, de nº. 011/2019.

2.1 População estudada

Foram utilizados 10 cães (*Canis lupus familiaris*), cinco machos e cinco fêmeas, adultos (entre 1 e 2 anos de idade), procedentes do atendimento ambulatorial de Diagnóstico e Tratamento de Leishmaniose Visceral Canina do HV da UFRPE. Todos os animais foram submetidos a pesquisa direta de hematozoários, sendo negativos para piroplasmas, *Ehrlichia* sp., *Anaplasma platys* e *Hepatozoon canis*. Em relação a vacinação, todos os animais estavam imunizados apenas contra raiva. Os animais foram mantidos no domicílio sob a responsabilidade de seus tutores e foram acompanhados durante um mês pela equipe de veterinários responsáveis. A alimentação dos animais era a base de rações comerciais.

2.2 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

O diagnóstico foi realizado através da punção aspirativa de medula óssea junto à manúbrio do osso esterno, utilizando-se seringas de 20mL e agulhas hipodérmicas 40x1,20. Do material obtido, foi realizado esfregaços em lâminas de vidro. Após secagem, foram fixados com álcool metílico, corados pelo método de coloração de Romanowsky e examinados em microscópio de luz, detectando-se as formas amastigotas de *Leishmania* sp.

2.3 Tratamento

Foi prescrita a associação entre domperidona, utilizada uma vez ao dia, na dosagem de 1 mg/kg, segundo Meireles (2008), e alopurinol, administrado duas vezes ao dia, na dosagem de 10 mg/kg como descrito por Guinel et al (1998) e Saridomichelakis (2005), ambos durante 30 dias.

2.4 Mielograma

O material foi obtido conforme descrito anteriormente e os esfregaços foram examinados em microscópio de luz para exame citopatológico segundo Harvey (2012). As séries eritróide, mieloide, linfóide, monocítica e megacariocítica foram avaliadas quanto à frequência, maturidade e morfologia através da contagem diferencial de 500 células. A determinação da relação mieloide/eritróide (M:E) foi obtida dividindo-se o número total de células da série mieloide pelo número total de células nucleadas da série eritróide.

2.5 Análise Estatística

As medianas e quartis 25% e 75% foram utilizados para avaliar as variáveis contínuas dos parâmetros laboratoriais. Para verificar a existência de significância entre as variáveis contínuas antes (D0) e 30 dias após o início do tratamento (D30), utilizou-se o teste Wilcoxon. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico computacional GraphPad Prism 5.0 e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

3 Resultados

Em 70% dos animais, formas amastigotas de *Leishmania* sp. foram visibilizadas após tratamento (Figura 1. D). Com relação as alterações morfológicas, foi observado binucleação celular (Figura 1. B) e presença de mitoses atípicas (Figura 1. A) em 20% dos cães, além de leucofagocitose (Figura 1. C), também observada em 20% (2/10) dos animais. Os resultados detalhados dos mielogramas nos diferentes dias de avaliação estão dispostos na tabela 1.

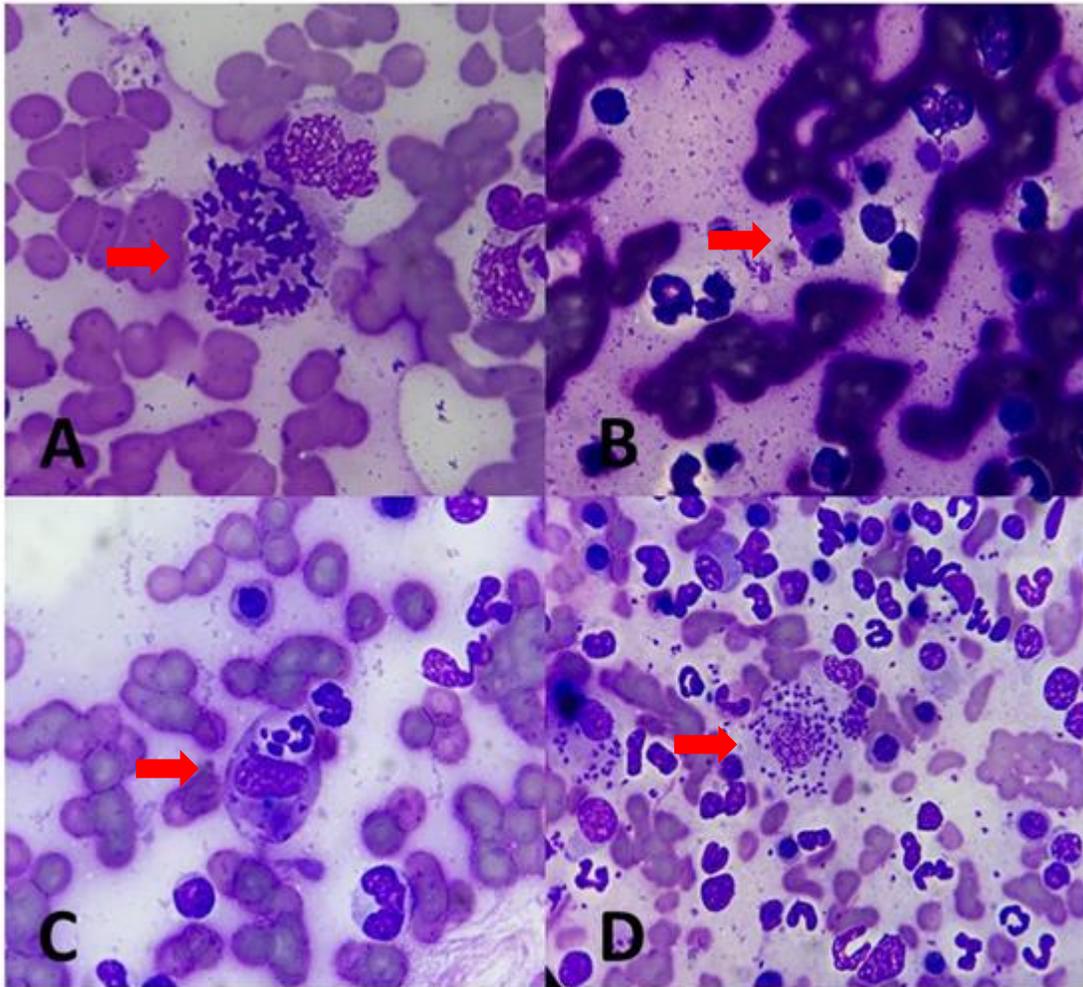


Figura 1. Esfregaços de medula óssea de cães com *Leishmania infantum*. **A.** Mitose atípica. **B.** Binucleação de precursor eritróide. **C.** Leucofagocitose. **D.** Formas amastigotas de *Leishmania* sp. livres e fagocitadas por macrófago.

Tabela 1. Avaliação da celularidade da medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes e após tratamento com alopurinol e domperidona.

| Parâmetros | Cães positivos para <i>L. infantum</i> | | Valores de referência em cão adulto |
|--------------------------|--|---------------------|-------------------------------------|
| | D0 (n=10) | D30 (n=10) | |
| Série eritróide | | | |
| Rubriblasto | 0,35 (0-0,6)* | 0,35 (0,15-0,86) | 0,2-1,1 |
| Prorrubricito | 0,9 (0,62-1,52) | 0,8 (0,5-1,35) | 0,9-2,2 |
| Rubricito | 23,75 (17,6-27,43) | 21,65 (12,53-26,23) | 19,2-35,1 |
| Metarubricito | 8,9 (6,75-11,0) | 8,8 (6,0-9,8) | 9,2-16,4 |
| Série mielóide | | | |
| Mieloblasto | 0,6 (0,22-0,9) | 0,4 (0-0,65) | 0,4-1,1 |
| Prómielócito | 0,6 (0,3-0,75) | 0,5 (0,37-0,7) | 1,1-2,3 |
| Mielócito neutrófilo | 2,35 (1,9-3,5) | 2,55 (1,17-3,5) | 3,1-6,1 |
| Mielócito eosinófilo | 0 (0-1,0) | 0 (0-0,37) | 0-2,07 |
| Metamielócito neutrófilo | 3,7 (3,1-4,52) | 4,15 (2,37-5,22) | 5,3-8,8 |
| Metamielócito eosinófilo | 0 (0-0,47) | 0 (0-0,52) | 0-2,81 |
| Bastonete neutrófilo | 11,15 (9,02-12,25) | 11,25 (8,9-11,7) | 12,7-17,2 |
| Bastonete eosinófilo | 0 (0-0,07) | 0 (0-0,07) | 0,07-2,81 |
| Neutrófilos | 31,75 (27,6-40,5) | 35,65 (33,1-39,6) | 13,8-24,2 |
| Eosinófilos | 2,6 (1,15-3,65) | 3,95 (1,45-6,85) | 3,6 |
| Outros | | | |
| Linfócitos | 4,85 (3,3-5,9) | 3,8 (2,6-7,1) | 1,7-4,9 |
| Plasmócitos | 2,3 (1,45-4,8) | 2,75 (1,57-3,3) | 0,6-2,4 |
| Macrófagos | 2,45 (1,9-4,2) | 1,9 (1,2-3,1) | 0-0,4 |
| M:E | 1,57 (1,16-2,44) | 1,8 (1,5-3,2) | 0,9-1,76 |
| Megacariócitos | 4,2 (1,9-6,0) | 3,5 (2,8-6,1) | |

*Mediana (percentis 25 – 75).

^bP<0,05, teste de Wilcoxon comparando cães no D0 e D30.

Valores de referência em cão adulto (HARVEY, 2012).

4 Discussão

O achado de formas amastigotas de *Leishmania* sp na medula óssea assegura a punção aspirativa de medula óssea como o método padrão ouro no diagnóstico da LVC, fato este que tem sido confirmado por vários autores (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005; MAIA e CAMPINO, 2008; ANTUNES et al., 2018).

No que concerne a série eritróide, a redução no número de metarrubricitos antes e depois do tratamento, sem haver redução no número dos demais precursores da linhagem eritróide, indica que houve produção adequada, porém a maturação foi incompleta, o que deve refletir no desenvolvimento de anemia nos animais com LVC (NICOLATO et al., 2013; ALMEIDA, 2017). A displasia eritróide, com a presença de

precursores binucleados aqui observado está de acordo com os resultados de Miranda (2018) e Manzillo et. al. (2006), que chama atenção para as alterações na celularidade por maturação incompleta dessa série em cães com leishmaniose visceral.

A neutrofilia vista na série mielóide em ambos os tempos estudados, também foi observada por Nicolato e colaboradores (2013), sendo um achado comum em algumas doenças inflamatórias crônicas, como a LVC, onde as citocinas inflamatórias estimulam a produção de fatores de crescimento (CFU-GM e CFU-G) na medula óssea. Também ocorre liberação aumentada de neutrófilos do compartimento de armazenamento como resposta ao processo inflamatório (FURZE e RANKIN, 2008; STOCKHAM E SCOTT, 2011; Pereira et. al., 2017), o que pode explicar o aumento dessa célula no mielograma dos animais avaliados.

Vale salientar que além dos neutrófilos serem considerados os principais mediadores inflamatórios na LV, ocorre também um recrutamento destas células com intuito de debelar a infecção através de mecanismos incluindo fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (YIZENGAW et al., 2016).

O valor aumentado no número de macrófagos aqui observado tanto no dia zero como no dia 30, em relação ao valor de referência, é indicativo de uma boa resposta do organismo, tendo em vista que essas células têm como principal função restringir a replicação de microorganismos celulares (SHALM'S, 2010). Resultados semelhante foram observados por Almeida et. al. (2017) associando o aumento do número de macrófagos com a progressão da doença.

A diminuição de megacariócitos observada nos dois períodos estudados, também tem sido reportado por Manzillo et. al. (2006), em função da cronicidade da infecção por *L. infantum*, tendo como consequência uma diminuição na produção desta linhagem celular.

O aumento no número de plasmócitos no dia 30 pós tratamento encontra-se de acordo Miranda (2018). Gavvani et al. (2002) sugeriram que o parasito induza uma resposta humoral não protetora, que leva a uma hipergamaglobulinemia, contribuindo para a formação de imunocomplexos que podem se depositar em diversos tecidos.

As alterações morfológicas observadas nesse trabalho também foram vistas em outros estudos que avaliaram as alterações morfológicas da medula óssea em cães com

leishmaniose visceral (MIRANDA, 2018; MOMO et al., 2014), sendo normalmente atribuídas ao aumento de citonas inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ (YARALI et al., 2002; MANZILLO et al., 2006).

Em relação ao tratamento instituído, com associação de alopurinol e domperidona, não foi observada diferença significativa, de acordo com o teste de Wilcoxon, nos achados do mielograma nos dois períodos avaliados. Esse fato ocorreu provavelmente pelo curto período de tratamento, já que de acordo com Solano-Gallego et al. (2011), a maioria dos cães apresentam melhora clínica no primeiro mês de tratamento, porém tempos mais longos de terapia são necessários para avaliação na resposta da celularidade da medula óssea.

5 Conclusão

Com os resultados desse trabalho, conclui-se que o mielograma não é uma ferramenta adequada para o acompanhamento dos animais com leishmaniose visceral submetidos a tratamento experimental, quando se quer avaliar a resposta do paciente em um curto período de tratamento. Dessa forma, estudos com tempos mais longos de acompanhamento são necessários para elucidar a fisiopatogenia da *Leishmania infantum* na medula óssea e uma possível resposta ao tratamento.

Referências

ABREU, R. T.; CARVALHO, M. G.; CANEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; COURA-VITAL, W.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (leishmania) chagasi*. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-9, 2011.

ALMEIDA, V. A. Alterações na medula óssea e distúrbios hematológicos na leishmaniose visceral canina. 2017. 101f. **Tese** (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2017.

ANDRADE, H. M.; TOLEDO, V. P. C. P.; PINHEIRO, M. B.; GUIMARAES, T. M. P. D.; OLIVEIRA, N. C.; CASTRO, J. A.; SILVA, R. N.; AMORIM, A. C.; BRANDAO, R. M. S. S.; YOKO, M.; SILVA, A. S.; DUMONT, K.; RIBEIRO, M. L.; BARTCHEWSKY, W.; MONTE, S. J. H. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 83-90, 2011.

ANTUNES, T. R.; GODOY, K. C. S.; OLIVEIRA, G. G.; SILVEIRA, A. W.; RAMOS, C. A. N. R.; SOUZA, A. I. Técnicas de citologia aspirativa, biópsia e citobloco de medula óssea para identificação e determinação de intensidade parasitária na leishmaniose visceral canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 1362-1368, 2018.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; OTRANTO, D.. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; NETO, B. E. L.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.

FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. **Immunology**, v. 125, p. 281–288, 2008.

GAVGANI, A.S.; MOHITE, H.; EDRISSIAN, G.H.; MOHEBALI, M; DAVIES, C.R. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.67, p. 511–515, 2002.

HARVEY, J. W. **Veterinary Hematology. A Diagnostic Guide and Color Atlas**. 1 ed. Missouri: Elsevier, 2012.

LAISON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, 100, p. 811-827, 2005.

LOPES, P. M.; SORTE, E. C. B.; GASPARETTO, N. D.; OLIVEIRA, C. M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. F. R. Seroprevalence and risk factors associated with visceral leishmaniasis in dogs in Jaciara, State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 791-795, 2014.

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

MANZILLO, V. F.; RESTUCCI, B.; PAGANO, A.; GRADONI, L.; OLIVIA, G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Record**, v. 158, p. 690-694, 2006.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5515-5519, 2005.

MIRANDA, D. F. H. Alterações na medula óssea de cães com leishmaniose visceral: um estudo clínico-patológico. 2018. 122f. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 2018.

MIRO, G.; GALVEZ, R.; FRAILE, C.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 52, p. 1-7, 2011.

MOMO, C.; JACINTHO, A. P. P.; MOREIRA, P. R. R.; MUNARI, D. P.; MACHADO, G. F.; VASCONCELOS, R. O. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Medicine International**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

NERY, G.; BECERRA, D. R. D.; BORJA, L. S.; MAGALHES-JUNIOR, J. T.; SOUZA, B. M. P. S.; FRANKE, C. R.; VERAS, P. S. T.; LARANGEIRA, T. F.; BARROUIN-MELO, S. M. Avaliação da infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 701-707, 2017.

NICOLATO, R. C.; ABREU, R. T.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; CARVALHO, M. G.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; BOUILLET, L. E. M.; LEMOS, D. S.; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B. 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.

PAYANO, V. J. H. Avaliação dos achados clínicos, hematológicos e bioquímico sérico em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* submetidos a tratamento experimental. 2018. 70f. **Dissertação** (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2018.

PEREIRA, M.; VALERIO-BOLAS, A.; SANTOS-MATEUS, D.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SANTOS, M.; RODRIGUES, A.; ROCHA, H.; SANTOS, A.; MARTINS, C.; TOMAS, A.; PASSERO, F.; FONSECA, I. P.; SANTOS-GOMES, G. Canine neutrophils activate effector mechanisms in response to *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 248, p. 10-20, 2017.

POSTIGO, J. A. R. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, suplemento 1, p. 62-65, 2010.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 68-75, 2006.

RIBEIRO, R. R.; MOURA, E. P.; PIMENTEL, V. M.; SAMPAIO, W. M.; SILVA, S. M.; SCHETTINI, D. A.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; TAFURI, W. L.; DEMICHELI, C.; MELO,

M. N.; FREZARD, F.; MICHALICK, M. S. M. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 2564-2572, 2008.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L. S.; BILLININS, C.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; GOULETSOU, P.; DIAKOU, A; KONTOS, V. I. Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 199–205, 2005.

SCHALM'S Veterinary hematology. 6. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. 1232p.

STOCKHAM, S. L., SCOTT, M. A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 729p.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRO, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 86, p. 1-16, 2011.

ULCHAR, I.; CELESKA, I.; STEFANOVSKA J.; JAKIMOVSKA, A. Hematological and biochemical parameters in symptomatic and asymptomatic leishmania-seropositive dogs. **Macedonian Veterinary Review**, v. 38, n. 2, p. 175-182, 2015.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 851-855, 2014.

YIZENGAW, E.; GETAHUN, W.; TAJEBE, F.; CERVERA, E. C.; ADEM, E.; MESFIN, G.; HAILU, A.; AUWERA, G. G.; YARDLEY, V.; LEMMA, M.; SKHEDY, Z.; DIRO, E.; YESHANAW, A.; MELKAMU, R.; MENGESHA, B.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; MÜLLER, I.; TAKELE, Y.; KROPF, P. Visceral leishmaniasis patients display altered composition and maturity of neutrophils as well as impaired neutrophil effector functions. **Frontiers of Immunology**, v. 7, n. 517, p. 1-12, 2016.

YARALI, N.; FISGIN, T.; DURU, F.; KARA, A. Myelodysplastic Features in Visceral Leishmaniasis. **American Journal of Hematology**, v. 71, p. 191-195, 2002.

CAPÍTULO II

QUANTIFICATION OF *Leishmania infantum* PARASITE LOAD IN THE BONE MARROW OF DOGS SUBMITTED A TREATMENT OF DOMEPERIDONE IN COMBINATION OF ALLOPURINOL

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the parasite load in the bone marrow of dogs with natural infection of *L. infantum* submitted a treatment of domperidone in combination of allopurinol. Eleven dogs domiciliated, five males and five females, with age between 1 and 2 years old were selected. The dogs were treated orally with domperidone, 1 mg/kg (sid) in combination of allopurinol 10 mg/kg (bid) for 30 days. Bone marrow aspiration was performed on the sternal bone manubrium using syringes of 20mL and hypodermic needles 40x1,20. For the extraction of DNA from bone marrow cells, we used the kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), according to the manufacturer's recommendations. Reactions for absolute quantitation (qPCR) were performed with the Applied Biosystems PowerUp SYBR Green Master Mix amplification mix on a QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System thermal cycler (Thermo Fisher Scientific). Bone marrow parasitic load revealed that 54.5% (6/11) of the animals had decreased parasite load, while 45.4% (5/11) showed an increase in quantification 30 days after treatment (Graph 1). The average quantification on day zero and day 30 was 4,424.82 and 16,673.2 parasites/ μ L, respectively, but there was no significant difference between the studied periods ($p=0.05$). Therefore, the results obtained in our study confirm that the 30-day follow-up of the animals is not sufficient to notice a satisfactory parasitological response, and a long-term study is needed to understand the possible mechanisms associated with bone marrow parasite loading during treatment of canine visceral leishmaniosis.

Key words: Parasite load. Treatment. Bone marrow. Extraction. DNA.

1 Introduction

Among the various clinical presentation of *Leishmania infantum*'s infection in dogs, cutaneous lesions, including dermatitis, ulcers, nodules, alopecia and onychogryphosis, are the most common signs in dogs (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; SILVA et al., 2017). On the other hand, because the high number of asymptomatic animals (MANNA et al., 2009), the early diagnosis of infection is considered a great way to treat and prevent outbreaks.

Although the diagnostic methods based on parasite detection, particularly the bone marrow biopsy is considered the gold standard (FARIA and ANDRADE, 2012), they are invasive and present poor sensitivity. Otherwise, the immunological methods present high sensitivity and have limited specificity (MANNA et al., 2008). In recent years, several PCR protocols have been applied successfully to detect *L. infantum*, particularly to monitoring dogs submitted to treatment (PENISSI et al., 2005; MANNA et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

But the therapy of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is still a challenge not only because of the intracellular localization of the parasite but also the persistence of parasite load in various tissues (MANNA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008) after the treatment.

In some countries of Europe, the treatment of CVL include meglumine antimoniate, aminosidine and miltefosine in combination with allopurinol which one has demonstrated good clinical efficacy, but they not achieve complete cure of the disease. In Brazil miltefosine has just been recommended for the treatment of CVL. Usually the treatment of CVL is classified as inefficacious because the parasitic load did not decrease after the therapeutic procedures and dogs remains a reservoir of *Leishmania*'s infections and relapses are common (ANDRADE et al., 2011).

In this way the persistence of parasites in cutaneous lesions, blood, conjunctival mucosa, lymph node and also bone marrow have been documented in asymptomatic and symptomatic dogs after the treatment.

In Brazil, few studies have been conducted by using of leishmaniostatic and immunomodulatory drugs in the treatment of CVL and the parasite load in body tissues. The aim of this study was to investigate the parasite load in the bone marrow of dogs with

natural infection of *L. infantum* submitted a treatment of domperidone in combination of alloupurinol.

2 Materials and Methods

The experimental protocol was approved by the institutional Ethics Committee, nº. 011/2019.

2.1 Animal selection

Ten dogs domiciliated, five males and five females, with age between 1 and 2 years old were selected. The *L. infantum* infection was determined by clinical, parasitological (bone marrow biopsy) and serological (immunocroato graphic rapid test DPP®) diagnoses. Clinical examination was performed before (day zero) and after therapy (30 days). Also, all dogs were evaluated for the presence of clinical signs associated with other vector borne disease. During the experiment, these animals were kept at home under the responsibility of their guardians.

2.2 Treatment

The dogs were treated orally with domperidone, 1 mg/kg (SID) body weight (Meireles, 2008) in combination of alopurinol, 10 mg/kg (bid) as described by Guinel et al (1998) and Saridomichelakis (2005) for 30 days.

2.3 Bone marrow collection

Bone marrow aspiration was performed on the sternal bone manubrium using syringes of 20mL and hypodermic needles 40x1,20. The obtained material was placed in plastic microtubes of 2mL with 10 µL of EDTA to 3% diluted in sterile physiological solution.

2.4 Parasitic load

For the extraction of DNA from bone marrow cells, we used the kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), according to the manufacturer's

recommendations. As a target for detection of the parasite, the primers used were Linf.1-23F: 5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3' and Linf.1-154R: 5'-TTACACCAACCCCCAGTTTC-3', as described by Cavalcanti et al. (2009).

Reactions for absolute quantitation (qPCR) were performed with the Applied Biosystems PowerUp SYBR Green Master Mix amplification mix on a QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System thermal cycler (Thermo Fisher Scientific). Serial dilution of *L. infantum* standard DNA was used to evaluate the system detection limit (1ng-1fg).

In each reaction, 2µL of DNA, 12.5µL of PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 1.0µL of primer sense and antisense (10pM) and 8.5µL of water were used for injection, totaling a final volume of 25µL. The first step of the amplification protocol consisted of DNA denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification (95°C/15 s, 60°C/1 min). All assays were performed in duplicate and contained negative controls (non-template controls) and a positive standard curve of *L. infantum*.

2.5 Statistical analysis

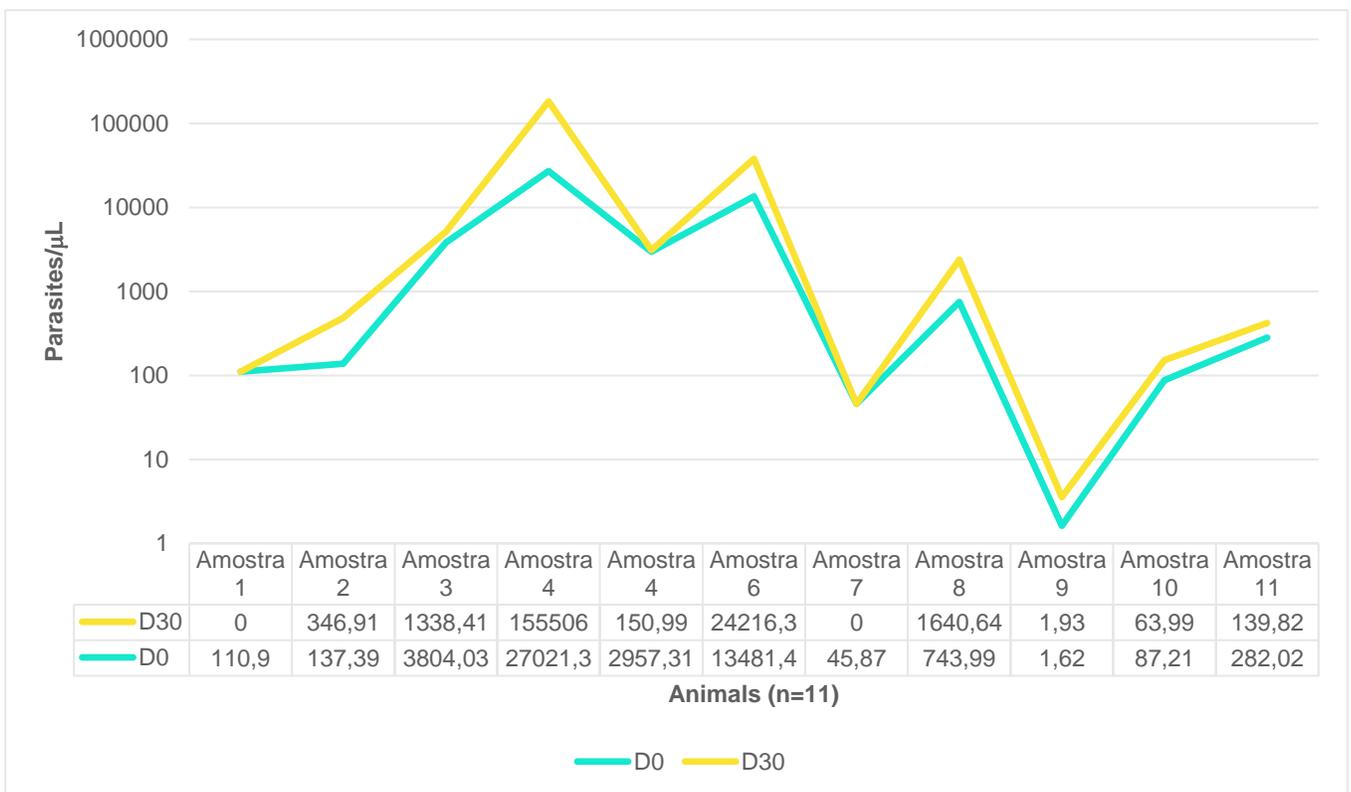
Medians and quartiles 25% and 75% were used to evaluate continuous variables of parasitic load. To verify the existence of significance between continuous variables before (D0) and 30 days after the beginning of treatment (D30), the Wilcoxon test was used. Analyzes were performed using the GraphPad Prism 5.0 computer statistical program and the significance level was set at 5%.

3 Results

The most observed clinical signs on D0 were dermatopathies and lymphadenomegaly (90.9%), followed by onychogryphosis (72.7%) and ophthalmopathies (27.3%). On day 30, clinical improvement was observed, even with persistence of some signs such as dermatopathies, lymphadenomegaly and onychogryphosis (81.8%, 72.7% and 54.5%, respectively), and the same value in cases of ophthalmopathies (27.3%). In both moments of the study, none of the animals showed

signs suggestive of hemoparasitosis as well as a positive parasitological/bacteriological diagnosis.

Bone marrow parasitic load revealed that 54.5% (6/11) of the animals had decreased parasite load, while 45.4% (5/11) showed an increase in quantification 30 days after treatment (Graph 1). The average quantification on day zero and day 30 was 4,424.82 and 16,673.2 parasites/ μ L, respectively, but there was no significant difference between the studied periods ($p=0.05$).



Graph 1. Bone marrow parasitic load on day zero (D0) and 30 days after experimental treatment (D30) of allopurinol-associated domperidone in dogs with *natural Leishmania infantum* infection.

4 Discussion

CVL is a systemic disease and may involve many organs and tissues, manifesting itself as nonspecific clinical signs. The clinical signs found here were dermatopathies,

onychogryphosis and lymphadenomegaly, corroborating the clinical findings in dogs with natural *L. infantum* infection (MIRÓ et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

With the introduction of allopurinol and domperidone therapy, the animals showed clinical response, according to Payano (2018) data, which observed clinical improvement after 60 days of treatment. Cavaliero et al (1999) and Miranda (2018) noted clinical improvement in animals treated exclusively with allopurinol at different treatment times. In a study used as monotherapy, domperidone was effective in reducing clinical signs and antibody titers, as well as improving the cellular immune response with lymphocyte proliferation (GOMES-OCHOA et al., 2009).

Reis et al. (2006) observed a positive correlation between bone marrow parasitism and clinical disease, where the evolution of asymptomatic to symptomatic animals was accompanied by intense bone marrow parasitism. High parasitic loads were also detected by Francino et al (2006), Belinchón-Lorenzo et al. (2016), Ramos et al (2013) and Hernández et al. (2015) in bone marrow samples.

According to Reis et al. (2006), analyzes pointed to the bone marrow as the place that most correlates with the clinical signs of CVL. In their studies, they demonstrated that symptomatic dogs have intense parasitic load on bone marrow and spleen when compared to asymptomatic animals. Regarding the parasitic load on the bone marrow, the data found here revealed that despite the clinical improvement, it was possible to observe an increase in the average value of the parasite load 30 days after treatment.

According to Carter et al. (1989), parasites can be found in the spleen and bone marrow even after treatment, suggesting that the resistance of the parasite is due to the anatomy of these organs that does not allow the drug to reach, or due to underdosing. Regarding the molecules used, although allopurinol is a leishmanistatic drug, when used as monotherapy it has efficiency in clinical improvement of patients but is unable to completely eliminate the parasite (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005). Manna et al. (2008) observed that even after 24 months of allopurinol treatment, the parasite may persist in the tissues.

The results observed here, even coming from animals that were evaluated 30 days after treatment, are in agreement with Penissi et al (2005) who reported the clinical

improvement of dogs treated with allopurinol as monotherapy for 90 days, but the parasitic load of blood and lymph node samples did not undergo significant changes.

Allopurinol, a xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase inhibitor, has as its major metabolite alloxanthin, which has a long stay in tissues (ZAGER & GMUR, 1989; INSEL, 1996), especially in the liver and intestinal mucosa where activity of xanthine oxidase is high. The low concentration of the drug in the bone marrow and spleen may justify the permanence and increased parasitic load of *Leishmania sp.* in these tissues even after treatment.

The persistence of *L. infantum* in 81.8% of allopurinol and domperidone treated animals is consistent with the observations of Miró et al. (2011) that ensure that in some animals the elimination of the parasite does not occur. This maintenance of the parasite may be due to the molecule's own leishmaniostatic effect or resistance to allopurinol (YASUR-LANDAU et al., 2016).

Studies have focused on the importance of bone marrow as a target for monitoring parasite load reduction after treatment, demonstrating the effectiveness of different drugs in reducing parasite load in different tissues (RIBEIRO et al., 2008). Travi et al (2018) state that treatment goals are multiple, ranging from clinical improvement of animals to parasitological cure, providing increased life expectancy of treated animals.

The duration of allopurinol treatment depends on disease severity, clinical conditions, parasitological response to treatment and individual drug tolerance (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). The same author states that allopurinol can only be discontinued when there is recovery in physical examination and laboratory tests, in addition to notable reduction in antibody levels.

The new therapeutic trend is the combination of immunomodulators and drugs leishmaniostatic, in order to reduce the parasitic load and establish an appropriate immune response (TRAVI et al., 2018). Studies have also demonstrated the effectiveness of immunomodulators in preventing leishmaniosis in endemic areas (SABATE et al., 2014).

5 Conclusion

Experimental treatment combined with domperidone and allopurinol promoted clinical improvement in animals, but there was no reduction in parasite load of the bone marrow during the study period. Therefore, the results obtained in our study confirm that the 30-day follow-up of the animals is not sufficient to notice a satisfactory parasitological response, and a long-term study is needed to understand the possible mechanisms associated with bone marrow parasite loading during treatment of canine visceral leishmaniosis.

Bibliographic reference

ANDRADE, H. M.; TOLEDO, V. P. C. P.; PINHEIRO, M. B.; GUIMARAES, T. M. P. D.; OLIVEIRA, N. C.; CASTRO, J. A.; SILVA, R. N.; AMORIM, A. C.; BRANDAO, R. M. S. S.; YOKO, M.; SILVA, A. S.; DUMONT, K.; RIBEIRO, M. L.; BARTCHEWSKY, W.; MONTE, S. J. H. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 83-90, 2011.

BELINCHÓN-LORENZO, S.; PAREJO, J. C.; INIESTA, V.; FERNANDEZ-COTRINA, J.; MONOZ-MADRID, R.; MONROY, I.; BAZ, V.; GOMES-LUQUE, A.; SERRANO-AGUILERA, F. J.; BARNETO, J. L.; GOMEZ-NIETO, L. C. First detection of *Leishmania* kDNA in canine cerumen samples by qPCR. **Veterinary parasitology**, v. 228, p. 65-68, 2016.

CARTER, K. C.; DOLAN, T. F.; ALEXANDER, J.; BAILLIE, A. J.; MCCOLGAN, C. Visceral leishmaniasis: drug carrier system characteristics and the ability to clear parasites from the liver, spleen and bone marrow in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 41, n. 2, p. 87-91, 1989.

CAVALCANTI, M. P.; BRITO, M. E. F.; SOUZA, W. V.; GOMES, Y. M.; ABATH, F. G. C. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 356-358, 2009.

CAVALIERO, T.; ARNOLD, P.; MATHIS, A.; GLAUS, T.; HOFMANN-LEHMANN, R.; DEPLAZES, P. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 13, n. 4, p. 330-334, 1999.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, p. 47-57, 2012.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214–221, 2006.

GOMEZ-OCHOA, P.; CASTILLO, J. A.; GASCÓN, M.; ZARATE, J. J.; ALVAREZ, F.; COUTO, C. G. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 259-263, 2009.

HERNÁNDEZ, L.; MONTOYA, A.; CHECA, R.; DADO, D.; GALVEZ, R.; OTRANTO, D.; LATROFA, M. S.; BANETH, G.; MIRÓ, G. Course of experimental infection of canine leishmaniasis: follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. **Veterinary parasitology**, v. 207, n. 1-2, p. 149-155, 2015.

INSEL, PA. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, JG & LIM81RD, LE (Eds). Goodman & Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics** . 9 ed. New York: McGraw-Hill, p. 617-658, 1996.

MANNA, L.; GRAVINO, A. E.; PICILLO, E.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.. 2008a. Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, p. 358–360, 2008a.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PICILLO, E.; PAVONE, L. M.; GRAVINO, A. E. Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 279-282, 2008.

MANNA, et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Journal**, v.182, p. 441–445, 2009.

MIRANDA, D. F. H. Alterações na medula óssea de cães com leishmaniose visceral: um estudo clínico-patológico. 2018. 122f. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 2018.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v.24, p.371-377, 2008.

PAYANO, V. J. H. Avaliação dos achados clínicos, hematológicos e bioquímico sérico em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* submetidos a tratamento experimental. 2018. 70f. **Dissertação** (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2018.

PENNISI, M.G.; REALE, S.; GIUDICE, S.L.; MASUCCI, M.; CARACAPPA, S.; VITALE, M.; VITALE, F. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. **Veterinary Research Communications**, v. 20, suplemento 2, p. 301-303, 2005.

RAMOS, R. A. N.; RAMOS, C. A. N.; SANTOS, E. M.; ARAUJO, F. R.; CARVALHO, G. A.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 346-350, 2013.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 68-75, 2006.

RIBEIRO, R. R.; MOURA, E. P.; PIMENTEL, V. M.; SAMPAIO, W. M.; SILVA, S. M.; SCHETTINI, D. A.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; TAFURI, W. L.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; FREZARD, F.; MICHALICK, M. S. M. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 2564-2572, 2008.

SABATÉ, D.; LLINÁS, J.; HOMEDES, J.; SUST, M.; FERRER, L. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. **Preventive veterinary medicine**, v. 115, n. 1-2, p. 56-63, 2014.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L. S.; BILLININS, C.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; GOULETSOU, P.; DIAKOU, A; KONTOS, V. I. Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 199–205, 2005.

SILVA, D. J.; MELO, D. H. M.; COSTA, A. G.; COSTA, D. F.; SILVA, R. B. S.; MELO, M. A.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1292-1298, 2017.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRO, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 86, p. 1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; PETERSEN, C.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; MIRÓ, G.; FERRER, L.; BANETH, G. Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 9, p. 706-717, 2017.

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRO, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. 1-13, 2018.

ZAGER, R.A.; GMUR, D.J. Effects of xanthine oxidase inhibition on ischemic acute renal failure. **Acta Physiologica**, vol. 257 p.953-8, 1989.

YASUR-LANDAU, D.; JAFFE, C. L.; DAVID, L.; BANETH, G. Allopurinol resistance in *Leishmania infantum* from dogs with disease relapse. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1-6, 2016.