



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DO USO DO TIAZOACETILPIRIMIDA 04 (TAP – 04) NO
TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL
POR *Leishmania infantum***

EIJI KEVIN NAKASONE NAKASONE

RECIFE – PE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DO USO DO TIAZOACETILPIRIMIDA 04 (TAP – 04) NO
TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL
POR *Leishmania infantum*

EIJI KEVIN NAKASONE NAKASONE

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE – PE

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)

- N163a Nakasone, Eiji
AVALIAÇÃO DO USO DE TIAZOLACETILPIRIMIDA 04 (TAP 04) NO TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania infantum* / Eiji Nakasone. - 2020.
63 f. : il.
- Orientador: Leucio Camara Alves.
Coorientadora: Milena de Paiva.
Inclui referências e apêndice(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.
1. Leishmaniose visceral canina. 2. Clínica veterinária. 3. Doenças parasitárias. I. Alves, Leucio Camara, orient. II. Paiva, Milena de, coorient. III. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DO USO DO TIAZOACETILPIRIMIDA 04 (TAP – 04) NO
TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL
POR *Leishmania infantum*

EIJI KEVIN NAKASONE NAKASONE

ORIENTADOR

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves
Departamento de Medicina Veterinária -UFRPE

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior
Departamento de Medicina Veterinária -UFRPE

Professora Dra. Ana Cristina Lima Leite
Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE

Professor Dr. Vinícius Vasconcelos Gomez de Oliveira
Medicina Veterinária da UNINASSAU

A Amy que desde que chegou mudou
minha vida 360 graus e que é o motivo
para que eu tente ser melhor cada dia.

“Você não pode abrir mão de algo que você
realmente acredita por razões financeiras.
Se você morrer na beira da estrada que assim seja.
Mas pelo menos você sabe que tentou.
Dez minutos na cena da música era igual a cem anos fora dela.

Robert Plant”

AGRADECIMENTOS

A meus pais Oscar e Gloria que apesar da distância me acompanham em cada aventura que eu faço e me incentivam ser melhor cada dia.

A meus irmãos Hika e Kimi que foram os primeiros cúmplices e às vezes vítimas desta aventura, obrigado por todos os momentos que passamos juntos e passaremos.

A minhas avós, tios, tias, primos, primas e Nicky que ajudaram para que pudesse chegar até aqui.

Ao professor Lêucio Câmara Alves pela oportunidade oferecida, paciência e confiança, pela ajuda em todo momento neste desafio de fazer o mestrado no lugar novo, desde minha chegada ao Brasil até hoje e talvez no futuro também.

À equipe do laboratório de doenças parasitárias, aos residentes, mestrandos e doutorandos os quais apoiaram com o novo idioma, nova cultura e dos quais aprendi muitas coisas, obrigado pela paciência para escutar e tentar entender meu português e toda a ajuda que recebi.

A Dra. Milena de Paiva e sua equipe da Fundação Oswaldo Cruz- CpqAM também obrigado pela paciência, a confiança e ajuda em todo momento.

Aos meus amigos no Peru e os novos amigos que fiz aqui no Brasil, pelo apoio.

Aos tutores dos cães que permitiram realizar as coletas e tratamento de seus animais e particularmente aos animais que apesar das punções venosas ainda abanaram a cauda com alegria para nós.

Ao programa de Bolsas da Organização dos Estados Americanos (OEA) e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) pela oportunidade de realizar um sonho e a bolsa de estudos.

RESUMO

Na atualidade, os tratamentos utilizados para a Leishmaniose Visceral Canina são variados e com diferentes resultados, os quais incluem drogas leishmanicidas, leishmaniostáticas, moduladores do sistema imune, além da terapia de apoio para controlar as complicações secundárias à doença. Devido às reações adversas aos diversos protocolos de tratamento para doença canina torna-se importante à busca de novos tratamentos. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de Tiazacetilpirimida 04 no tratamento de cães com infecção natural por *Leishmania infantum*. Para tanto foram utilizados seis cães, os quais receberam TAP – 04 na dose de 1mg/kg uma vez por semana por 12 semanas. Os animais foram monitorados semanalmente através da avaliação clínica, hematológica, bioquímica e determinação da carga parasitária. No dia zero a totalidade dos animais apresentaram linfadenomegalia, apatia e dermatopatias. Os resultados hematológicos revelaram que 83,33% (5/6) apresentaram anemia, sendo 33,33% (2/6) do tipo normocítica normocromica, 16,67% (1/6) microcítica normocromica e 33,33% (2/6) macrocítica normocromica. Com relação ao perfil leucocitário, 83,33% (5/6) apresentaram leucopenia, 66,67% (4/6) linfopenia, 33,33% (2/6) neutropenia, 16,67% (1/6) eosinofilia, diminuição do número de plaquetas foi observado em 50% (3/6), hiperproteinemia em 83,33% (5/6) e 100% apresentaram hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. O monitoramento do tratamento demonstrou que não houve uma diferença significativa nos escores clínicos dos animais estudados, contudo até 60 dias após o tratamento foi observado uma melhora nos os exames hematológicos, bioquímicos. A avaliação da carga parasitária demonstrou diminuição em 30% dos animais até o momento 60. Nesse sentido, novos estudos precisam ser realizados com um maior número de animais assim como com acompanhamento por maior tempo para avaliar a resposta dos animais com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento com TAP – 04.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, clínica veterinária, doenças parasitárias.

ABSTRACT

Currently, the treatments used for Canine Visceral Leishmaniasis are varied and with different results, which include leishmanicidal, leishmaniostatic drugs, immune system modulators, in addition to supportive therapy to control complications secondary to the disease. Due to the adverse reactions to the different treatment protocols for canine disease, it is important to search for new treatments. Therefore, the objective of this work was to evaluate the use of Tiazoacetylpyrimide 04 in the treatment of dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. For this purpose, six dogs were used, which received TAP - 04 at a dose of 1 mg/kg once a week for 12 weeks. The animals were monitored weekly through clinical, hematological, biochemical, and parasitic load determination. On day zero all animals presented lymphadenomegaly, apathy and dermatopathy. The hematological results revealed that 83.33% (5/6) presented anemia, 33.33% (2/6) of the normochromic normocytic type, 16.67% (1/6) normochromic microcytic, and 33.33% (2 / 6) normochromic macrocytic. Regarding the leukocyte profile, 83.33% (5/6) presented leukopenia, 66.67% (4/6) lymphopenia, 33.33% (2/6) neutropenia, 16.67% (1/6) eosinophilia, a decrease in the number of platelets was observed in 50% (3/6), hyperproteinemia in 83.33% (5/6) and 100% presented hypoalbuminemia and hyperglobulinemia. The monitoring of the treatment showed that there was no significant difference in the clinical scores of the animals studied, however, up to 60 days after the treatment, an improvement in the hematological and biochemical tests was observed. The evaluation of the parasitic load has shown a decrease of 30% in animals donated to date 60. In this sense, new studies need to be carried out with a greater number of animals as well as with a longer follow-up to evaluate the response of animals with natural infection by *L. infantum* submitted to treatment with TAP - 04.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, veterinary clinic, parasitic diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. - Ciclo biológico da *Leishmania infantum*.

Figura 2. - Representação esquemática do Tiazol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.- Frequência dos sinais clínicos observados nos animais com infecção natural por *L. infantum* no M0, M30, M60 e M90

Tabela 2.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 1 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 3.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 2 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 4.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 3 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 5.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 4 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 6.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 5 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 7.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 6 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 8.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 1 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 9.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 2 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 10.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 3 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 11.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 4 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 12.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 5 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 13.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 6 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Tabela 14.- Carga parasitaria dos animais com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04 nos momentos M0, M30, M60 e M90.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina amino transferasa

AST: Aspartato amino transferasa

BtCatB: Protease bovina

C: Carbono

CC₅₀: Concentração citotóxica para 50% dos macrófagos peritoneais

CD4+: Grupamento de diferenciação 4

CEUA: Comissão de Ética para uso de Animais

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

CPB2: Cisteino-proteases da *Leishmania*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DL₅₀: Dose única que pode causar a morte em 50% dos animais testados

DPP: Dual Path Platform

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

FA: Fosfatase alcalina

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

GGT: Gama glutamil transferase

IFN- γ : Interferon gama

IgG: Imunoglobulina G

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IS: Índice de seletividade

kg: Quilograma

LpQM: Laboratório de planejamento em Química Medicinal

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

M0: Momento zero

M30: Momento 30

M60: Momento 60

M90: Momento 90

MAPA: Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg: Miligrama

N: Nitrogênio

NO: Óxido Nítrico

OECD: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PTTa: Tempo de tromboplastina parcial

qPCR: PCR em tempo real

RNA: Ácido ribonucleico

S: Enxofre

SC: Subcutâneo

TAP – 04: Tiazolacetilpirimida 04

Th1: Linfócito T auxiliar 1

Th2: Linfócito T auxiliar 2

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TP: Tempo de protrombina

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

UFRPE: Universidade Federal Rural de Pernambuco

WHO: Organização Mundial da Saúde

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1.	Leishmaniose visceral	19
2.2.	Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	19
2.3.	Imunopatogenia da LVC	20
2.4.	Sinais clínicos da LVC	21
2.5.	Alterações hematológicas e bioquímicas	22
2.6.	Diagnóstico da LVC	24
2.7.	Tratamento da LVC	25
2.7.1.	Antimonial pentavalentes	25
2.7.2.	Alopurinol	26
2.7.3.	Anfotericina B	27
2.7.4.	Miltefosina	28
2.7.5.	Marbofloxacina	28
2.7.6.	Outros	29
3.	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
4.	OBJETIVOS	39
4.1.	Geral	39
4.2.	Específicos	39
	CAPÍTULO I	40
	Avaliação do uso do Tiazacetilpirimida 04 (tap – 04) no tratamento experimental de cães com infecção natural por <i>Leishmania infantum</i>	
	Resumo	41
	Abstract	42
	Introdução	43
	Material e métodos	44
	Aspectos éticos	44
	Animais	44
	Obtenção do composto TAP – 04	44

Tratamento dos animais	45
Avaliação clínica	45
Coleta das amostras	45
Exames laboratoriais	45
Análise de dados	46
Resultados	46
Sinais clínicos	46
Avaliações hematológicas	48
Avaliações bioquímicas	52
Carga parasitária	55
Discussão	56
Conclusão	58
Referências Bibliográficas	59

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários da família Trypanosomatidae (Döflein,1901) gênero *Leishmania* (Ross,1903), transmitidos aos hospedeiros susceptíveis por vetores, flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* (Rondani & Berté, 1840) ou *Lutzomyia* (França, 1924) no velho e novo mundo respectivamente (NOGUEIRA et al., 2018), apresentando distribuição mundial (PIGOTT, D. M. et al., 2014) com mais de 350 milhões de pessoas em risco de infecção (ALVAR et al., 2012; AKHOUNDI et al., 2016).

No Brasil, a Leishmaniose Visceral (LV) é causada pelo protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, com transmissão veiculada principalmente pela espécie *Lutzomyia longipalpis* durante o repasto sanguíneo (NOGUEIRA et al., 2018), tendo na cadeia epidemiologia participação de animais silvestres, sinatrópicos, silvestres e caninos domésticos (DANTAS-TORRES, FILIPE.; BRANDÃO-FILHO, 2006; SANTIAGO et al., 2007), sendo este último considerado principal reservatório, devida a relação estreita com o homem e a grande carga parasitária que tem na pele (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012; BORJA et al., 2016; TORRECILHA et al., 2016).

Nos cães, a LV é considerada como doença imunomediada e a progressão da infecção é caracterizada por acentuada resposta humoral com acentuada hipergamaglobulinemia e diminuição da resposta imune celular, determinando o surgimento de animais assintomáticos ou sintomáticos (SMELT et al., 2000; ROSSI; FASEL, 2018).

Independentemente da resposta e fase clínica dos cães infectados, o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem sido utilizado para remissão dos sinais clínicos e redução na capacidade infectante (VIANA et al., 2018).

Além disso, deve-se levar em consideração as infecções concomitantes, que se instalam pela imunossupressão na LVC que dificultam o diagnóstico, prognóstico e tratamento, principalmente as hemoparasitoses como erliquiose, babesiose, hepatozoonose, anaplasmose, filarioses, entre outras (DE TOMMASI et al., 2013; ATTIPA et al., 2018).

Sendo assim, atualmente, são utilizadas várias moléculas na terapia da LVC tanto aquelas com atividade leishmanicida e leishmaniostática quanto a moduladores

do sistema imune, além da terapia de suporte para controlar as complicações secundárias à doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Somente no ano de 2016, o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou a utilização da Miltefosina, agente antiprotozoário com ação leishmanicida, no tratamento da LVC no Brasil, (MAPA, 2016), porém o tratamento com esse fármaco requer a associação de alopurinol para melhor resposta terapêutica, uma vez que seu uso apenas diminui carga parasitária e remissão dos sinais clínicos (MANNA et al., 2009, 2015; REGUERA et al., 2016). As reações adversas pelo uso da miltefosina em cães incluem transtornos digestivos como vômitos e diarreias (MANNA et al., 2009; MATEO et al., 2009), que normalmente é reversível após um curto período (WOERLY et al., 2009; ANDRADE et al., 2011).

Devido às essas reações adversas, o desenvolvimento de cepas resistentes ao tratamento para LVC, aliado a toxicidade e ao alto custo, a descoberta de novos agentes com propriedades leishmanicida e/ou leishmanioestático se faz necessário.

Neste contexto, uma boa estratégia ter como alvo as cisteíno-proteasas que são enzimas cruciais para o metabolismo e reprodução do parasito (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS; DE SOUZA, 2001; SCHRÖDER et al., 2013). Entre estes estão inseridos os compostos derivados das estruturas do Tiazol, que apresentam propriedades anticâncer (POPSAVIN et al., 2012), antibacteriana (LU et al., 2012), anti-inflamatória (SHAFI et al., 2012), e antiprotozoário (LEITE et al., 2006; SCHRÖDER et al., 2013; CARDOSO et al., 2014).

O tiazooacetilpiridina 04 (TAP – 04) obtido a partir das tiossemicarbazonas depois da reação de Hantzsch com phenacyl bromide (CARDOSO et al., 2014) apresentou nos ensaios in vitro as maiores taxas de inibição da viabilidade das formas amastigotas de *Leishmania infantum* no interior do macrófago (VASCONCELOS GOMES DE OLIVEIRA, 2017).

Tendo em vista a necessidade de novos compostos com propriedades leishmanicida e/ou leishmanioestático com baixa toxicidade e custo no tratamento da LVC, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o composto TAP – 04 no tratamento experimental de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral apresenta distribuição cosmopolita e caráter endêmico em 65 países (MAIA-ELKHOURY et al., 2008), sendo que 90% dos casos se concentram em: Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão, Sudão do Sul e Brasil, país que concentra aproximadamente 90% dos casos das Américas (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; ALVAR et al., 2012; PIGOTT, D. M. et al., 2014).

No Brasil a enfermidade é causada principalmente por *Leishmania Leishmania infantum* (DANTAS-TORRES, 2009), e transmitido pela picada do *Lutzomyia longipalpis* durante o repasto sanguíneo, (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

No território brasileiro, a enfermidade é endêmica e se distribui amplamente em todos os estados, sendo que a região Nordeste detém o maior número de casos notificados, (DANTAS-TORRES, 2009; MINISTÉRIO DA SAUDE, 2019).

O cão doméstico é o principal reservatório da doença no ambiente urbano, quer pela alta prevalência da enfermidade nesta espécie ou pelo parasitismo cutâneo (DA COSTA-VAL et al., 2007; GOMES et al., 2008; LAURENTI et al., 2013; BORJA et al., 2016). Contudo, outros animais podem estar envolvidos na transmissão urbana como roedores, marsupiais, canídeos silvestres e primatas não humanos, sendo esses infectados preferencialmente no ambiente silvestre (DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006; ROQUE; JANSEN, 2014)

2.2. Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

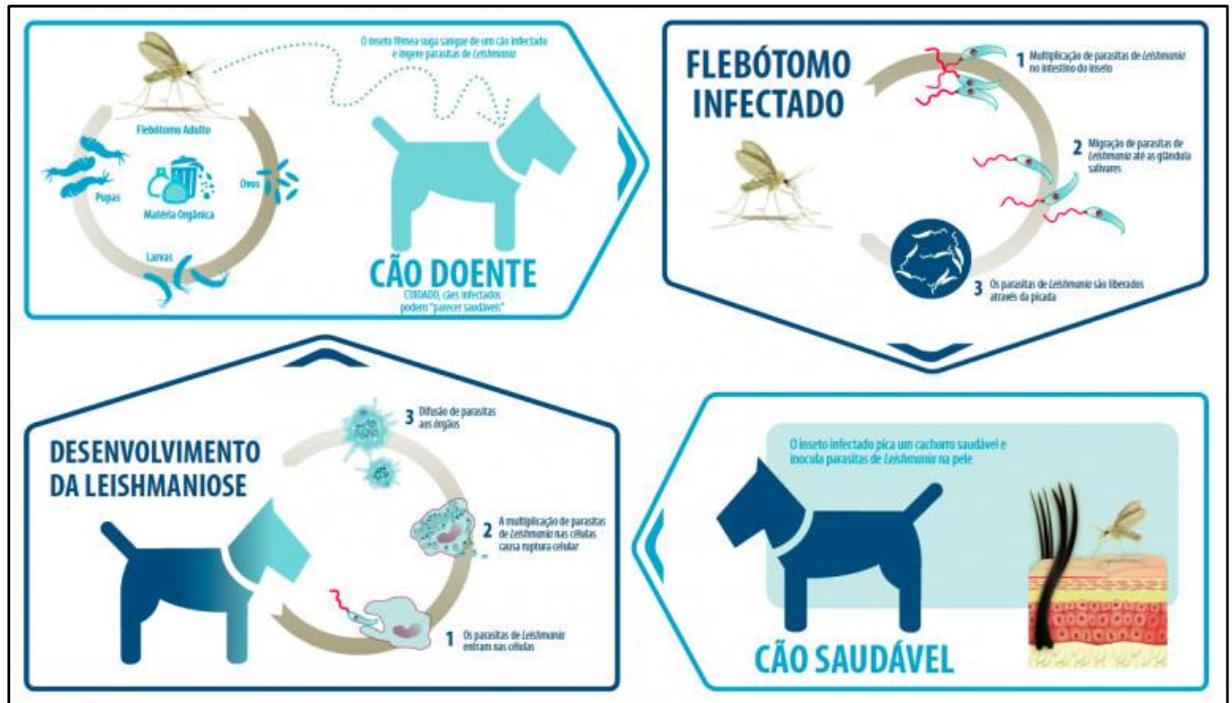
A LVC é endêmica em mais de 70 países, presente em regiões como sudoeste da Europa, África, Ásia, América do Sul e central, podendo uma enfermidade fatal nos cães (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; GREENE, 2015).

Na América do Sul, a maioria dos estudos de prevalência da LVC foram realizados no Brasil seguido da Argentina, Colômbia e Venezuela (DANTAS-TORRES, 2009). Porém, esses dados podem variar grandemente de região em região e dependendo da metodologia usada pode-se encontrar variação de prevalência de 25% até 75% dos cães infectados (DANTAS-TORRES, 2009).

Esses dados mostram que a infecção por *L. infantum* nos cães está amplamente distribuída, apresentando características clínicas diferentes (SOLANO-

GALLEGO et al., 2011, 2017). Os animais infectados podem apresentar sinais clínicos como: dermatopatias, linfadenomegalias, esplenomegalia, hepatomegalia, caquexia entre outros, ou não apresentarem nenhum sinal (animais assintomáticos) (BANETH et al., 2008; NICOLATO et al., 2013).

Figura 1.- Ciclo biológico da *Leishmania infantum*.



Fonte: <https://www.vetsmart.com>

2.3. Imunopatogenia da LVC

Durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos, as formas promastigotas dos parasitos são inoculados junto com a saliva dos insetos (GREENE, 2015). A partir daí, é imprescindível a interação do parasito com moléculas da membrana do macrófago para que ocorra a fagocitose (DE ALMEIDA LEAL et al., 2014; GREENE, 2015).

No interior dos macrófagos, ocorre uma resposta anti-*Leishmania* através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de Óxido Nitrico (NO) que podem destruir o parasito. Contudo, o parasito se transforma na forma amastigota o qual se multiplica por divisão binária e rompe a membrana celular do fagócito (ROSSI; FASEL, 2018), liberando estas formas que infectam outros macrófagos e células do sistema imune, além de migrarem para os órgãos linfáticos, principalmente medula óssea, linfonodos, baço e fígado e áreas da pele (GREENE, 2015).

A condição imunológica dos hospedeiros vertebrados em controlar a infecção está relacionada a dois fatores: o primeiro é uma resposta em que as células apresentadoras de antígenos, estimulam os linfócitos (CD4+) T auxiliares do tipo Th1, que secretam citocinas interferon gamma (IFN- γ), interleucinas 2 e 12 (IL-2, IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e citocinas pro-inflamatórias. As interleucinas IL-12 e IFN- γ são importantes indutores da produção de NO pelos macrófagos, que desencadeia a capacidade do hospedeiro em debelar a infecção (GREENE, 2015).

Por outro lado, os linfócitos (CD4+) T auxiliares do tipo Th2 são os responsáveis pela resposta humoral, que secretam citocinas IL-10 e IL-4, as quais desempenham papel supressor das citocinas protetoras (COURA-VITAL et al., 2011; DE ALMEIDA LEAL et al., 2014). Além disso, os linfócitos B produzem grandes quantidades de anticorpos, os quais são unidos aos antígenos do parasito formando imunocomplexos os quais se depositam em vários órgãos podendo ocasionar glomerulonefrites, uveítes, vasculites e poliartrites (GREENE, 2015).

2.4. Sinais clínicos da LVC

A LVC é essencialmente uma enfermidade crônica e sistêmica com sinais clínicos variados e inespecíficos isto devido aos diferentes mecanismos patológicos assim como os diferentes graus da resposta imune dos hospedeiros (GREENE, 2015; PIETRO et al., 2016).

Ao estabelecer-se a infecção mediante resposta de predomínio Th2, há o surgimento dos sinais clínicos, sendo os mais predominantes as linfadenomegalias e as dermatopatias (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Nas linfadenomegalias, há presença de centros germinativos hiperplásticos (hiperplasias das áreas dos linfócitos B) com presença de macrófagos com corpos tingíveis e uma depleção moderada da área paracortical (área dos linfócitos T) (GRADONI et al., 2002; BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). O tamanho dos linfonodos pode aumentar de duas a seis vezes, em relação ao seu tamanho normal (GREENE, 2015).

As dermatopatias variam entre 56% ao 90% (GREENE, 2015), principalmente, no plano nasal, pontas de orelhas e cauda (DA COSTA-VAL et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018). As lesões dermatológicas em sua maioria são simétricas, não pruríticas, alopecicas, que podem ser generalizadas,

locais ou multifocais (KOUTINAS et al., 1999). As dermatites descamativas e/ou excessiva seborreia seca são as dermatopatias mais comuns. Como segunda lesão mais comum estão as úlceras, e em menor frequência dermatites nodular, papular ou pustular, além de onicogribose (KOUTINAS et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; GREENE, 2015).

As alterações oculares podem ocorrer em 16-80% dos cães infectados. As lesões mais frequentes são: blefarites, ceratoconjuntivites e uveítes anterior. Nos anexos oculares os sinais mais comuns são: alopecia periocular, nódulos palpebrais e ceratoconjuntivite seca. Pode ocorrer ainda: ciclite, coriorretinite, descolamento da retina, catarata e glaucoma também foram reportadas (PIETRO et al., 2016).

Entretanto, os cães podem apresentar sinais clínicos sistêmicos tais como perda de peso, letargia, diminuição do apetite, polidipsia, poliúria, sinais gastrointestinais como vômitos ou diarreias e enfermidade renal (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; GREENE, 2015).

A doença renal pode ser a única manifestação clínica da leishmaniose e pode evoluir da proteinúria moderada até uma síndrome nefrótica ou à um estágio final da enfermidade renal. A doença renal crônica é o resultado severo da evolução da doença e a maior causa da mortandade na LVC. Não obstante, a presença de azotemia é incomum nos cães assintomáticos ou com poucos sinais clínicos (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Dentro das dificuldades locomotoras, as lesões das articulações e ossos pode ocorrer no 30-44,8% dos cães afetados. Nas poliartrites erosiva e não erosiva encontraram-se amastigotas no líquido sinovial (AGUT et al., 2003; BANETH et al., 2008). Outras alterações como osteomielite ou poliomielite, úlcera interdigital e periostite proliferativa podem aparecer, devido a deposição de imunocomplexos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; GREENE, 2015). Além disso à atrofia muscular esta associada com a polimiosite crônica, caracterizada pela presença de infiltrados monocíticos com amastigotas, vasculite neutrofílica e complexos imunes nos tecidos musculares em conjunto com anticorpos séricos anti-miofibras (BANETH et al., 2008).

A pesar de ser raros, sinais neurológicos e cardiorrespiratórios também podem ser visibilizados na LVC (DA COSTA-VAL et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

2.5. Alterações hematológicas e bioquímicas

Mesmo que as alterações hemato-bioquímicas são inespecíficas, são importantes para o diagnóstico, estadiamento da doença, monitoramento do tratamento e prognóstico desta (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; MIRÓ et al., 2017).

Nos exames hematológicos, a anemia é a alteração mais comum, sendo que 50-70% dos cães afetados apresentam uma anemia não regenerativa normocítica normocrômica (RIBEIRO et al., 2018). Isto sugere que a causa pode ser uma inflamação crônica e/ou a falha da eritropoiese devido as alterações na medula óssea (MO) e/ou nos rins (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018). Outras causas da anemia podem ser hemorragias, hemólise imunomediada ou a fluidez lipídica da membrana das hemácias (DA COSTA-VAL et al., 2007; BANETH et al., 2008).

A anemia é observada com maior frequência em animais sintomáticos, pois nestes a concentração de hemoglobina corpuscular media (CHCM) é menor do que nos animais assintomáticos, o que pode ser reflexo do dano na homeostase do ferro (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

A trombocitopenia é descrita como variável e geralmente é encontrada em baixa frequência. Assim como a trombocitose é um achado incomum em cães com LVC (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018). Outras alterações incluem trombocitopatias, falha na hemostasia secundária e fibrinolise (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018). O aumento do tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial (PTT_a) pode ser a causa da hiperfibrinogenemia (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018). Estas anomalias da coagulação em conjunto com a vasculite imunomediada e a hiperviscosidade sérica secundária à hiperproteinemia desempenham um papel importante na apresentação da epistaxe (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

Alteração no quadro leucocitário: neutrofilia madura e leucograma de estresse (neutrofilia, monocitose com linfopenia) (NICOLATO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2018). Estas alterações nas concentrações de leucócitos são uma resposta secundária ao estresse sofrido, além disso a inflamação crônica também pode estar envolvida (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

Embora não tenha correlação descrita entre a severidade da enfermidade e os valores dos leucócitos ou as diferentes populações destas, a linfopenia aumenta com

a severidade da enfermidade, o que pode estar associado ao estresse (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018). Contudo, apesar de ser incomum, a anemia, eosinopenia, linfopenia e monocitopenia são alterações reportadas como marca da disfunção hematológica associada à severidade da enfermidade (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

Dentre as alterações bioquímicas mais frequentes nos cães com LVC, estão relacionadas às proteínas (REIS et al., 2006; DA COSTA-VAL et al., 2007). Alterações da relação albumina/globulina são bastante comuns, devido a uma hiperproteinemia com aumentos nas frações beta e gama e hipoalbuminemia (REIS et al., 2006; DA COSTA-VAL et al., 2007; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

Outras variações comumente encontradas são a azotemia renal e a proteinúria glomerular. No entanto, raramente é observado azotemia no momento do diagnóstico, sendo a proteinúria sem azotemia renal o achado mais frequente, sendo provável que seja devido ao dano glomerular secundário a causa dos imunocomplexos (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

A lesão hepática se traduz por alteração das enzimas de colestase: Fosfatase Alcalina (FA), Gama Glutamil Transferase (GGT) e enzimas de necrose hepática: Alanina Animo Transferase (ALT) e Aspartato Amino Transferase (AST) e pode ser resultado da multiplicação dos parasitos no fígado e na progressão da enfermidade (TORRECILHA et al., 2016).

2.6. Diagnóstico da LVC

Para o diagnóstico da LVC, várias ferramentas podem ser utilizadas, embora não exista um diagnóstico com 100% de especificidade e sensibilidade (PESSOA-E-SILVA et al., 2019).

O diagnóstico parasitológico consiste na detecção direta do parasito, por meio de amostras biológicas como medula óssea, linfonodos, pele, fígado e baço (GREENE, 2015). A especificidade do diagnostico parasitológico é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, e depende de muitos fatores como: a coleta e preparação da amostra, as habilidades e experiência do examinador e a densidade do parasito no hospedeiro (GONTIJO; MELO, 2004; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005; GOMES et al., 2008).

O diagnóstico sorológico detecta a presença de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum*. A sensibilidade destes testes é tipicamente alta, mas a especificidade pode ser baixa, especialmente em áreas endêmicas com outros tripanossomatídeos e outros patógenos prevalentes como *Ehrlichia spp*, *Babesia spp* e *Anaplasma spp* (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; BARROS et al., 2012).

O Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu o uso do teste rápido Dual Path Platform (DPP® Bio Manguinhos), como método de triagem e o ensaio imunoenzimático (ELISA) como teste confirmatório, o qual possui uma boa sensibilidade com as amostras de cães sintomáticos, porém detecta poucos assintomáticos (52,9% a 66%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011; GRIMALDI et al., 2012; RIBEIRO et al., 2018).

A biologia molecular fornece um diagnóstico com boa sensibilidade e especificidade (PAIVA-CAVALCANTI; REGIS-DA-SILVA; GOMES, 2010). Em comparação aos outros métodos, apresentando maior sensibilidade nos pacientes assintomáticos, (GOMES et al., 2008).

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR) são provas que permitem identificar e amplificar sequências de DNA do parasito, podendo ser utilizado sangue, aspirado de linfonodos, aspirado de medula óssea, biopsia de pele e fígado (DE PAIVA CAVALCANTI et al., 2009; REIS et al., 2013; NUNES et al., 2015).

2.7. Tratamento da LVC

Apesar da cura parasitológica ser raramente observada e a reincidência da doença ocorrer frequentemente após o tratamento, é necessário conhecer os diferentes protocolos que existem, visto que estes promovem a cura clínica, melhoram a qualidade de vida dos cães, aumenta a expectativa de vida assim como de reduzir a carga parasitaria e a possibilidade de infetar novos vectores nas áreas endêmicas (RIBEIRO et al., 2018; TRAVI et al., 2018).

Há estudos com diferentes protocolos terapêuticos levando em consideração o estadiamento do paciente (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014). A decisão terapêutica deve ser feita após a avaliação clínica, clínica-laboratorial do animal e severidade da enfermidade (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

2.7.1. Antimonial pentavalentes

Desde princípios do século XX, as drogas antimoniais têm sido estudadas por seus efeitos terapêuticos contra doenças causadas por *Trypanosoma* e *Leishmania* (REGUERA et al., 2016).

São inibidores seletivos de enzimas de *Leishmania* que são requeridas para a oxidação do ácido glicolítico e ácido graxo. A biodisponibilidade, posteriormente das injeções subcutâneas (SC) estão ao redor de 92,% , sendo 80% excretado na urina após nove horas da administração (VALLADARES et al., 1996; BANETH; SHAW, 2002a; PLUMB, 2010).

O uso como monoterapia na dose de 75 mg/kg duas vezes por dia por via SC, pôde apresentar uma concentração plasmática maior que na dose de 100 mg/kg uma vez ao dia por três á quatro semanas (VALLADARES et al., 1996). Porém em períodos curtos pode levar as recidivas da doença, além de ter parasitos resistentes a droga (MATEO et al., 2009). Devido a isto protocolos com a associação ao alopurinol promove uma regressão dos sinais clínicos durante períodos mais longos (PLUMB, 2010; TORRES et al., 2011).

Como efeitos adversos podemos ter dor severa no local da aplicação, flebotoxicidade, tromboflebitis, fibroses muscular e abscessos, letargia, inapetência e vômitos. E como efeitos colaterais cardiotoxicidade e problemas gastrointestinais (REGUERA et al., 2016).

Segundo a portaria interministerial Nº 1.426 que proíbe o uso de medicamentos de uso humano para o tratamento da leishmaniose ou produtos que não estejam registrados no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2014).

2.7.2. Alopurinol

O alopurinol é uma droga leishmanioestática que induz a remissão dos sinais clínicos (REGUERA et al., 2016). Quimicamente é um análogo da purina, hipoxantina, que é metabolizado pelo parasito a trifosfato de nucleotídeo aminopirazolinazolepirimidina, o qual se integra ao RNA deste conduzindo a uma defeituosa formação das proteínas e a síntese de RNA (PLUMB, 2010; REGUERA et al., 2016). A biodisponibilidade por via oral é próximo aos 90% e a meia vida de eliminação é de quase 2,7 horas (LING et al., 1997; PLUMB, 2010).

Devido a baixa toxicidade ou ausência desta, a eficiência para promover a melhora clínica, o baixo custo e facilidade da administração via oral, é uma droga

amplamente utilizada para o tratamento da leishmaniose, e pode ser usada como monoterapia ou em associação com antimonias ou com miltefosina (BANETH; SHAW, 2002).

Como monoterapia está descrito na dose de 15-30 mg/kg/dia dividido em dois ou três doses diárias (NOLI; AUXILIA, 2005), no entanto não se tem informação suficiente para recomendar o uso como monoterapia (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Seu uso em terapias prolongadas em associação com antimoniais ou com miltefosina apresentou bons resultados (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Por outro lado, o uso combinado de antimoniato de glucantime na dose de 75-100 mg/kg SC uma vez ao dia ou 75 mg/kg SC duas vezes ao dia com alopurinol na dose 10-15 mg/kg via oral duas vezes ao dia, durante seis a 12 meses é considerado como primeira alternativa de tratamento na maioria dos casos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Os efeitos adversos são incomuns embora pode produzir xantínia e urólitos de xantina, mesmo assim é importante fazer controle da função hepática e renal (CAVALIERO et al., 1999).

O uso deste medicamento para o tratamento da LVC não é proibido, mas também não está licenciado.

2.7.3. Anfotericina B

A anfotericina B é um agente macrolídeos de polienos produzido a partir do *Streptomyces nodosus*, é antifúngica sistêmica, mas tem uma boa atividade contra protozoários, atua por união ao ergosterol em membranas celulares, alterando a permeabilidade para o potássio intracelular o que causa distúrbios metabólicos, tendo a morte do parasito (BANETH; SHAW, 2002). A meia vida de eliminação é de 24-48 horas mas depois de sete semanas ainda é encontrado na urina (PLUMB, 2010).

Para reduzir a toxicidade da anfotericina B, se desenvolveu uma formulação lipossomal o qual diminui a toxicidade em especial a renal. Para o tratamento é recomendável a utilização desta formulação em lugar da anfotericina livre, devido a sua alta eficácia e menor toxicidade. Uma das limitantes desta formulação é o alto custo (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015).

Os cães tratados tem uma melhora rápida, porém os casos de recidiva são elevados (NOLI; AUXILIA, 2005). A dose recomendada é de 0,5 – 0,8 mg/kg IV duas a três vezes à semana. (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (WHO) recomenda o uso deste medicamento em áreas não endêmicas devido ao desenvolvimento de cepas do parasito resistentes (BEST et al., 2014).

2.7.4. Miltefosina

A miltefosina, uma hexadecilfosfocolina foi originalmente estudada e classificada como uma droga anti-neoplásica. O potencial leishmanicida foi identificado na década de 1980, sendo a primeira droga oral anti-*Leishmania* (DOS SANTOS NOGUEIRA et al., 2019).

Esta droga se acumula nos macrófagos e inibe a biossíntese do receptor para o glicosil fosfatidil inositol (GPI). Uma das moléculas chave para a sobrevivência intracelular do parasito. A ação metabólica deste composto pode afetar a biossíntese de glicolipídios e glicoproteínas da membrana do parasito (DOS SANTOS NOGUEIRA et al., 2019).

Além de ser tóxico para a *Leishmania* também ajuda na ativação das células T e macrófagos, e a produção de iNOS e a síntese de NO dentro dos vacúolos parasitóforos (BANETH; SHAW, 2002; REGUERA et al., 2016).

Possuem uma biodisponibilidade estimada em 94% e o tempo da meia vida de eliminação é 159 horas, o que representa uma depuração plasmática lenta. Como consequência o grau de acumulação em sangue é cinco a seis vezes maior depois de uma administração repetida (REGUERA et al., 2016).

O uso como monoterapia na dose de 2 mg/kg uma vez ao dia por 28 dias via oral tem bons resultados, uma vez que os cães com LVC apresentam melhora clínica, entretanto foram reportadas recidivas (MANNA et al., 2009).

Dentro dos efeitos adversos estão dor intestinal, vômitos, diarreias, anorexia, diminuição do hematócrito e do contagem de células brancas (REGUERA et al., 2016).

2.7.5. Marbofloxacin

A marbofloxacin é uma fluoroquinolona sintética de terceira geração, se presume que atua inibindo a DNA-girase (uma topoisomerase tipo II), mas não atua sob as topoisomerasas dos mamíferos por ter diferentes estruturas a comparação das bacterianas. Em se tratando *Leishmania* a ação da marbofloxacin se dá de maneira análoga as bacterianas (ROUGIER et al., 2012).

A biodisponibilidade é de 94% e a meia vida de eliminação é de nove a 12 horas em média sendo eliminado 40% na urina e 15% é metabolizado no fígado (PLUMB, 2010).

Nos estudos realizados na dose de 2 mg/kg uma vez ao dia por 28 dias via oral, se observa a cura clínica a partir do terceiro mês, mas em animais que tiveram uma recidiva dos sinais, o tempo foi mais curto e a cura parasitológica não foi obtida. A eficácia deste medicamento é comparável ao da miltefosina (ROUGIER et al., 2012).

Dentro dos efeitos adversos estão as anormalidades cartilaginosas em animais jovens e disfunção gastrointestinais (PLUMB, 2010).

2.7.6. Outros tratamentos

Considerando os tratamentos previamente estudados, principalmente como monoterapia, não exibirem os resultados esperados, são necessários estudos com novas associações ou novas drogas, com a finalidade de diminuir os sinais clínicos e reduzir a toxicidade.

Nesse sentido, é importante o estudo de novos alvos terapêuticos como as cisteíno-proteases que são enzimas proteolíticas que são cruciais para o metabolismo e reprodução do parasito, que se encontra em grandes quantidades em lisossomos, principalmente nas formas amastigotas do parasito, mas pode ser encontrada também em outros compartimentos intracelulares (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS; DE SOUZA, 2001; SCHRÖDER et al., 2013).

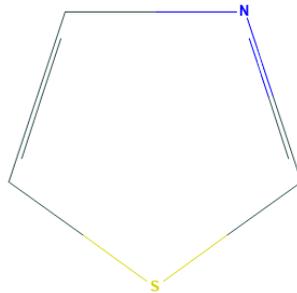
Entre os novos compostos estudados estão os Tiazóis que são compostos heterociclos aromáticos relacionados aos azois, que incluem o imidazol, oxazol e o tiazol. O tiazol é um anel de 5 membros dois vértices são nitrogênio e enxofre, e os outros três são carbonos (Figura 1). São uma parte importante da vitamina B1 (tiamina) e epotilona (TAHTACI et al., 2017).

Estudos recentes mostrou que as tiossemicarbazonas possuem ação inibitória sob as cisteíno-proteases (CARDOSO et al., 2014). Os componentes de tiossemicarbazonas e semicarbazonas foram identificados como inibidores específicos das cisteíno-proteases da leishmania (CPB2) e sem atividade contra as proteases bovinas (BtCatB) (SCHRÖDER et al., 2013).

A derivatização de grupos tiossemicarbazonas em porções tiazol gerou novos modelos os quais possuem atividade anti-tripanosoma, a tiossemicarbazona como núcleo ao qual podem se unir a outros grupos funcionais também foi descrito como possuidor de propriedades úteis como baixo peso molecular e uma síntese fácil e econômica além da importante atividade tripanosomicida (LEITE et al., 2006; CARDOSO et al., 2014).

A partir destes compostos foi obtido o tiazacetilpiridina 04 (TAP – 04), depois de passar pela reação de Hantzsch com brometo de fenacilo seguindo a metodologia descrita por CARDOSO et al. (2014). Nos ensaios *in vitro* foi observado um bom índice de seletividade (IS) que foi de 18,94 sob as formas promastigotas de *L infantum* e de 137,37 sob as formas amastigotas de *L infantum* no interior do macrófago. A concentração citotóxica para 50% dos macrófagos peritoneais (CC_{50}) foi de $59,09 \pm 15,19 \mu\text{M}$ e nos ensaios pré-clínicos feitos em hamsters mostraram que a dose única que pode causar a morte em 50% dos animais testados (DL_{50}) foi de 1000 mg/kg e classificado como categoria 4 segundo as diretrizes para o teste de produtos químicos da OECD OECD-423 (OECD, 2001) (VASCONCELOS GOMES DE OLIVEIRA, 2017).

Figura 2.- Representação esquemática do Tiazol.



Nota: Em azul o vértice com nitrogênio (N), em verde os vértices com carbonos (C) e em amarelo o vértice com enxofre (S).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUT, A. et al. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. **Veterinary Record**, v. 153, n. 21, p. 648–652, 22 nov. 2003.

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

ANDRADE, H. M. et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 83–90, 2011.

ATTIPA, C. et al. Association between canine leishmaniosis and Ehrlichia canis co-infection: A prospective case-control study. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, 2018.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. P324-330, 2008.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 315–324, 2002.

BARROS, J. H. S. et al. Occurrence of Trypanosoma caninum in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: What is the real impact of canine leishmaniasis control? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 7, p. 419–423, jul. 2012.

BEST, M. P. et al. The diagnosis and management of a case of leishmaniosis in a dog imported to Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3–4, p. 292–295, 2014.

BORJA, L. S. et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by Leishmania infantum is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p. 110–117, 2016.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose**

visceral. [s.l: s.n.].

CARDOSO, M. V. D. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 48–59, 30 out. 2014.

CAVALIERO, T. et al. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with Leishmania infantum. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 4, p. 330–334, jul. 1999.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. **New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2015. Disponível em: <<http://dx.>>. Acesso em: 26 jan. 2020

COURA-VITAL, W. et al. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural Leishmania infantum infection. **Veterinary Journal**, v. 190, n. 2, p. e43–e47, 2011.

DA COSTA-VAL, A. P. et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis infectivity. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636–643, nov. 2007.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites and Vectors**, v. 2, n. SUPPL.1, p. 1–8, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F. D; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1–2, p. 54–60, 2006.

DE ALMEIDA FERREIRA, S. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of Leishmania infantum DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. 1–9, 2012.

DE ALMEIDA LEAL, G. G. et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by Leishmania infantum. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 472–482, 2014.

DE PAIVA CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of Leishmania infantum DNA in canine blood. **Veterinary Journal**, v.

182, n. 2, p. 356–358, nov. 2009.

DE TOMMASI, A. S. et al. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, 2013.

DOS SANTOS NOGUEIRA, F. et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, 2019.

GOMES, Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45–52, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GREENE. **Infectious Diseases of the Dog and Cat 4th Edition**. 4th. ed. [s.l.: s.n.]. v. 1

GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP®CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59, 2012.

KOUTINAS, A. F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 376–383, 1999.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013.

LEITE, A. C. L. et al. Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 3749–3757, 2006.

LING, G. V. et al. Pharmacokinetics of allopurinol in Dalmatian dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 134–138, 1997.

LU, X. et al. Synthesis and evaluation of anti-tubercular and antibacterial activities of new 4-(2,6-dichlorobenzyloxy)phenyl thiazole, oxazole and imidazole derivatives.

Part 2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 164–171, mar. 2012.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica**, v. 24, n. 12, p. 2941–2947, 2008.

MANNA, L. et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 3, p. 441–445, 2009.

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

MATEO, M. et al. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. **Parasitology Research**, v. 105, n. 1, p. 155–162, 2009.

MELÉNDEZ-LAZO, A. et al. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. **Research in Veterinary Science**, v. 117, n. August 2016, p. 18–27, 2018.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Nota Técnica Nº 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/MapaNota Técnica**. [s.l: s.n.].

MIRÓ, G. et al. **Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis** *Trends in Parasitology*, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.005>>. Acesso em: 20 set. 2018

NICOLATO, R. D. C. et al. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

NOGUEIRA, C. T. et al. Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 197–201, 2018.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. **Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: A systematic review** *Veterinary Dermatology*, ago. 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*, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.002>>. Acesso em: 20 set. 2018

NUNES, C. M. et al. Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniosis diagnosis in a longitudinal study Testes sorológicos, parasitológicos e moleculares para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em estudo longitudinal. **Electronic) Braz. J. Vet. Parasitol. Jaboticabal**, v. 24, n. 4, p. 402–409, 2015.

OLIVEIRA-LIMA, J. W. et al. Canine Leishmaniasis: Forum Proceedings of the Second International Forum. **Canine leishmaniasis: Moving towards a solution.**, p. 7–14, 2002.

OPS/OMS | Información general: Leishmaniasis. Disponível em:

<https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417:2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40250&lang=es>. Acesso em: 5 set. 2018.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of leishmania (*leishmania*) *infantum* infection: A mini-review. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 537–542, 2010.

PESSOA-E-SILVA, R. et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 9–16, abr. 2019.

PIETRO, S. DI et al. Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned-client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary World**, v. 9, n. 6, p. 633–637, 2016.

PIGOTT, D. M., S. et al. Global distribution maps of the Leishmaniasis. **eLife**, v. 2014, n. 3, p. 1–21, 2014.

PLUMB. **Manual de farmacologia veterinária**. 6ta. ed. Buenos Aires, Argentina: Intermedica, 2010.

POPSAVIN, M. et al. Synthesis and in vitro antitumour screening of 2-(β -d-xylofuranosyl) thiazole-4-carboxamide and two novel thiazofurin analogues with substituted tetrahydrofurodioxol moiety as a sugar mimic. **Bioorganic and Medicinal**

Chemistry Letters, v. 22, n. 21, p. 6700–6704, 1 nov. 2012.

REGUERA, R. M. et al. **Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis****Veterinary Parasitology**, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.011>>. Acesso em: 3 set. 2018

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006.

REIS, L. E. S. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 498–503, 2013.

RIBEIRO, R. R. et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, n. C1, 2018.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

ROUGIER, S. et al. One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 245–253, 25 maio 2012.

SANTIAGO, M. E. B. et al. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 4, p. 283–290, 2007.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 82–86, 2005.

SCHRÖDER, J. et al. Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB. v. 8,

n. 10, p. 1–12, 2013.

SHAFI, S. et al. Synthesis of novel 2-mercapto benzothiazole and 1,2,3-triazole based bis-heterocycles: Their anti-inflammatory and anti-nociceptive activities.

European Journal of Medicinal Chemistry, v. 49, p. 324–333, mar. 2012.

SMELT, S. C. et al. B Cell-Deficient Mice Are Highly Resistant to *Leishmania donovani* Infection, but Develop Neutrophil-Mediated Tissue Pathology. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3681–3688, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. **Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines** **Trends in Parasitology**, 2017.

TAHTACI, H. et al. Synthesis, Structural Characterization, and Biological Evaluation of Novel Substituted 1,3-Thiazole Derivatives Containing Schiff Bases. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 183–193, jan. 2017.

TORRECILHA, R. B. P. et al. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 132, p. 83–87, 2016.

TORRES, M. et al. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Veterinary Journal**, v. 188, n. 3, p. 346–351, 2011.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. 2018.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. Megosome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: A morphometric and cytochemical study. **Parasitology Research**, v. 87, n. 2, p. 89–97, 15 jan. 2001.

VALLADARES, J. E. et al. Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. **Veterinary Record**, v. 138, n. 8, p. 181–183,

24 fev. 1996.

VASCONCELOS GOMES DE OLIVEIRA, V. **Aspectos relacionados à transmissão e à atividade biológica de tiazóis sobre Leishmania (Leishmania) infantum (Nicolle, 1908)**. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2017.

VIANA, K. F. et al. Therapeutic vaccine of killed *Leishmania amazonensis* plus saponin reduced parasite burden in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 254, n. March, p. 98–104, 2018.

WOERLY, V. et al. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitology Research**, v. 105, n. 2, p. 463–469, 2009.

Objetivos

4.1 Geral

- Avaliar o uso do Tiazacetilpirimida 04 (TAP – 04) no tratamento experimental de cães com infecção natural por *Leishmania infantum*.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a resposta clínica dos animais naturalmente infectados com *Leishmania infantum* submetidos a tratamento experimental com o composto TAP - 04;
- Avaliar o perfil hematológico e bioquímico dos animais naturalmente infectados com *Leishmania infantum* durante o tratamento experimental;
- Quantificar a carga parasitária em sangue através da Reação da Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR) dos animais com infecção natural por *Leishmania infantum* submetidos ao tratamento experimental.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DO USO DO TIAZOACETILPIRIMIDA 04 (TAP – 04) NO
TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR
Leishmania infantum

Resumo

A LVC é uma doença essencialmente crônica e sistêmica com sinais clínicos variados e inespecíficos, que pode acometer qualquer órgão ou tecido. Ao estabelecer-se a infecção mediante resposta de predomínio Th2, há o surgimento dos sinais clínicos, sendo os mais predominantes as linfadenomegalias e as dermatopatias entre outros sinais. Independentemente da resposta e fase clínica dos cães infectados, o tratamento da LVC tem sido utilizado para remissão dos sinais clínicos e redução na capacidade infectante. Além disso, às reações adversas aos diversos protocolos de tratamento torna-se importante à busca de novos tratamentos. Sendo assim o objetivo deste projeto foi de avaliar o uso de Tiazacetilpirimida 04 no tratamento de cães com infecção natural por *Leishmania infantum*. Seis cães foram tratados com o TAP – 04 na dose 1mg/kg uma vez por semana por doze semanas. Para tanto, foi realizada a avaliação clínica, hematológica bioquímica, além da determinação da carga parasitária em animais com infecção natural submetido ao tratamento experimental com o composto a TAP – 04. Os animais foram monitorados semanalmente através da avaliação clínica, hematológica bioquímica, e a determinação da carga parasitária. O 100% (6/6) apresentou linfadenomegalias, estado de ânimo apático e algum tipo de dermatopatia. Os resultados hematológicos observados revelaram que o 83,33% (4/6) apresentaram anemia, 83,33% (5/6) apresentaram leucopenia, linfopenia o 66,67% (4/6), neutropenia 33,33% (2/6), eosinofilia 16,67% (1/6), plaquetopenia 50% (3/6) e o 83,33% (5/6) apresentaram hiperproteinemia. O 83,33% (5/6) dos cães avaliados apresentaram hiperproteinemia, 100% apresentaram hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. 33,33% (2/6) apresentaram AST aumentado e 16,67% (1/6) ALT aumentado. O monitoramento do tratamento demonstrou que não houve uma diferença significativa nos escores clínicos dos animais estudados, contudo até 60 dias após o tratamento foi observado uma melhora nos os exames hematológicos, bioquímicos. A avaliação da carga parasitária demonstrou diminuição em 30% dos animais até o momento 60. Nesse sentido, novos estudos precisam ser realizados com um maior número de animais assim como com acompanhamento por maior tempo para avaliar a resposta dos animais com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento com TAP – 04.

Palavras chaves: Leishmaniose visceral canina, medicina veterinária, doença parasitaria.

Abstract

CVL is an essentially chronic and systemic disease with varied and nonspecific clinical signs, which can affect any organ or tissue. When the infection is established through a predominant Th2 response, clinical signs appear, the most prevalent being lymphadenomegaly and dermatopathies, among other signs. Regardless of the response and clinical stage of infected dogs, the treatment of CVL has been used to remission of clinical signs and reduction in infective capacity. Besides, adverse reactions to the various treatment protocols become important in the search for new treatments. Therefore, the objective of this project was to evaluate the use of Tiazoacetylpyrimide 04 in the treatment of dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. Six dogs were treated with TAP - 04 at a dose of 1mg / kg once a week for twelve weeks. To this end, a clinical, hematological biochemical evaluation was carried out, in addition to determining the parasitic load in animals with natural infection submitted to experimental treatment with the compound TAP - 04. The animals were monitored weekly through clinical, hematological biochemical evaluation, and the determination of the parasitic load. The 100% (6/6) presented lymphadenomegaly, apathetic state of mind and some type of dermatopathy. The hematological results observed revealed that 83.33% (4/6) presented anemia, 83.33% (5/6) presented leukopenia, lymphopenia o 66.67% (4/6), neutropenia 33.33% (2 / 6), eosinophilia 16.67% (1/6), thrombocytopenia 50% (3/6) and 83.33% (5/6) presented hyperproteinemia. 83.33% (5/6) of the dogs evaluated presented hyperproteinemia, 100% presented hypoalbuminemia and hyperglobulinemia. 33.33% (2/6) presented increased AST and 16.67% (1/6) increased ALT. The monitoring of the treatment showed that there was no significant difference in the clinical scores of the animals studied, however, up to 60 days after the treatment, an improvement in the hematological and biochemical tests was observed. The evaluation of the parasitic load has shown a decrease of 30% in animals donated to date 60. In this sense, new studies need to be carried out with a greater number of animals as well as with a longer follow-up to evaluate the response of animals with natural infection by *L. infantum* submitted to treatment with TAP - 04.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, veterinary medicine, parasitic disease.

Introdução

Nos cães, a leishmaniose visceral é considerada uma doença imunomediada e a progressão da infecção é essencialmente uma enfermidade crônica e sistêmica com sinais clínicos variados e inespecíficos, que pode acometer qualquer órgão ou tecido (GREENE, 2015), caracterizada por acentuada resposta humoral e diminuição da resposta imune celular, determinando o surgimento de animais assintomáticos ou sintomáticos (SMELT et al., 2000; ROSSI; FASEL, 2018).

Ao estabelecer-se a infecção mediante resposta de predomínio Th2, há o surgimento dos sinais clínicos, sendo os mais predominantes as linfadenomegalias e as dermatopatias (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011), oftalmopatias, (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; GREENE, 2015), perda de peso, letargia, diminuição do apetite, polidipsia, poliúria, sinais gastrointestinais como vômitos, ou diarreias podem estar relacionados com a enfermidade renal crônica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; GREENE, 2015).

Independentemente da resposta e fase clínica dos cães infectados, o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem sido utilizado para remissão dos sinais clínicos e redução na capacidade infectante dos flebotomíneos (VIANA et al., 2018).

Atualmente, são utilizadas várias drogas na terapia da LVC tanto fármacos ativos contra *Leishmania* (HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017) quanto moduladores do sistema imunitário e terapia de suporte para controlar as complicações secundárias à doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Devido às reações adversas ao tratamento para LVC, toxicidade e alto custo, a busca de novas moléculas com atividade leishmanicida e com pouca toxicidade tem sido investigada.

Neste sentido, a derivatização de grupos thiosemicarbazonas em porções tiazol poderia gerar novos modelos para a utilização destes como novas substâncias úteis para o tratamento da leishmaniose (CARDOSO et al., 2014). Resultados clínicos na doença de chagas experimental tem sido observado com a utilização de tiazóis (NAVARRETE-VAZQUEZ et al., 2011) e com atividade leishmanicida (NAVA-ZUAZO et al., 2014), especificamente do tiazacetilpiridina 04 (TAP – 04) que apresentou inibição da multiplicação das formas amastigotas de *Leishmania* sp no interior do

macrófago (GOMES DE OLIVEIRA, 2017).

Sendo assim o objetivo deste trabalho e avaliar o uso do Tiazacetilpirimida 04 (TAP – 04) no tratamento experimental de cães com infecção natural por *Leishmania infantum*.

Material e Métodos

Aspectos Éticos

Para a execução da pesquisa, todos os procedimentos foram realizados mediante a aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – licença nº 077/2019.

Animais

Foram selecionados seis animais com sintomatologia clínica sugestiva para LVC. Todos os cães eram domiciliados na Região Metropolitana do Recife, de ambos os sexos, com idades entre oito meses e 108 meses e de distintas raças. Foram atendidos no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Todos os animais apresentavam pelo menos um sinal clínico sugestivo de LVC, foram positivos no exame parasitológico (biópsia de medula óssea, aspirado de linfonodo e citologia esfoliativa) e teste sorológico (DPP® – BioManguinhos).

Foram excluídos os animais com enfermidades concomitantes como erlichiose, babesiose, diforilariose, anaplasnose, entre outras. Também não foram incluídos os animais que estivessem o tiveram tratamento para LVC dentro dos seis meses anteriores.

Os animais permaneceram em suas residências durante todo o período do tratamento e as avaliações periódicas foram conduzidas no ambulatório semanalmente por um período de três meses. Coleiras repelentes, impregnadas com inseticidas foram utilizadas nos animais, para evitar a contaminação de vetores e reinfeção dos cães.

Obtenção do composto TAP – 04

O tiazacetilpiridina (TAP – 04), foi produzida no Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A

síntese dos compostos da series tiazopirimida (TP) e tiazacetilpirimida (TAP) foi a partir da ciclização da tiossemicarbazona em tiazol segundo Cardoso et al., (2014).

Tratamento dos animais

Os animais receberam TAP-04 na dose de 1mg/kg em DSMO (1 ml) + água q.s.p 10 ml por via oral uma vez por semana durante 12 semanas.

Avaliação clínica

Os animais foram avaliados clinicamente e os dados obtidos foram anotados em uma ficha de identificação individual. Cada parâmetro clínico foi classificado de acordo a sua gravidade em uma escala numérica de 0 a 3 para os escores clínicos adaptado de Mateo et al (2009), onde a ausência do sinal clínico é 0, o sinal leve 1, 2 para o moderado e 3 para o severo. Em caso da temperatura corporal foi da seguinte maneira: hipo/hipertermia 1, normotermia 0, nos casos de linfadenomegalia e dermatites (alopecia, ulcerativa, nodular e papular) a classificação foi da seguinte maneira: ausente 0, local 1 e generalizada 2. A soma das pontuações foi calculada adicionado os pontos dados a cada um dos 13 parâmetros clínicos avaliados em cada momento do monitoramento.

Coleta das amostras

As coletas das amostras foram realizadas antes do início do tratamento definido como momento zero (M0), e 30 dias (M30), 60 dias (M60) e 90 dias (M90) após o início de tratamento.

As amostras de sangue foram coletadas da veia cefálica e colocados em 2 tubos sem anticoagulante para a obtenção de soro e um tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a realização do hemograma e qPCR.

A punção da medula óssea foi realizada no manúbrio do osso esterno, e do linfonodo foi no poplíteo. Posteriormente, foram confeccionados estiraços em lâminas de microscopia e coradas pelo método do tipo Romanowsky. A observação das formas amastigotas compatíveis com *Leishmania infantum* foram realizadas através de microscopia ótica em aumento 40x e 100x.

Exames laboratoriais

Foram realizados hemogramas de forma manual, o contagem das hemácias e leucócitos foi realizado por meio da câmara de Neubauer e o contagem diferencial por

meio de esfregaços de sangue periférico e observados ao microscópio óptico (LATIMER et al., 2005; WEISS; WARDROP, 2010).

No exame bioquímico, foram realizadas a dosagem de proteínas totais, albumina e globulina, ALT, AST, FA, GGT, ureia e creatinina no analisador automático TP-ANALYZER BASIC®.

Para a quantificação da carga parasitária foi usado o sistema LINF-1B e o termociclador Applied Biosystems® 7500. A extração do DNA foi a partir das amostras de sangue utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN® Sample and Assay Technologies) segundo as instruções do fabricante. A sequência utilizada foi NCBI com número de acesso Z35273.1 da *L. Infantum*, e os primers foram Linf.1-23F (5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3') e Linf.1-154R (TTACACCAACCCCCAGTTTC-3') que amplifica produtos de 132 pares de bases (Tm 81 °C) (DE PAIVA CAVALCANTI et al., 2009).

Análise de dados

Para a análise estatística utilizou-se o teste de Friedman para a comparação entre as avaliações em cada momento e nas variáveis categóricas foram utilizados simultaneamente os testes Exato de Fisher e Mc-Nemar. No caso de diferença significativa pelo teste de Friedman foram utilizados testes de comparações múltiplas do referido teste. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IBM SPSS na versão 23.

Resultados

Animais

Foram seis animais que completaram o protocolo de 12 semanas de tratamento. Destes seis animais o 33,33% (2/6) foram machos e 66,67% (4/6) foram fêmeas. A idade média no começo dos tratamentos foi 5 anos (intervalo 1 – 9 anos).

Sinais clínicos

No momento zero (M0), todos os animais apresentavam pelo menos um sinal clínico sugestivo da LVC. O 100% (6/6) apresentou linfadenomegalias, estado de ânimo apático e algum tipo de dermatopatias, entre as dermatopatias o 83,33% (5/6) apresentou alopecia e/ou dermatite descamativa, o 66,67% (4/6) dermatite ulcerativa

e/ou onicogrifose e o 33,33% (2/6) apresentou dermatite nodular. O 50% (3/6) apresentou hiporexia e/ou uma condição corporal magra e 66,67% (4/6) apresentou mucosas hipocoradas.

O paciente 1 no M0 apresentou um score clínico de 10, no M30 um score clínico de 5, no M60 um score clínico de 4 e no M90 de 4. Exibiu uma diminuição do M0 ao M30 de 50%, do M30 ao M60 de 20% e do M60 ao M90 não apresentou diminuição.

O paciente 2 no M0 apresentou um score clínico de 11, no M30 de 5, no M60 de 6 e no M90 de 7. Exibiu uma diminuição do M0 ao M30 de 54,5%, do M30 ao M60 exibiu um aumento de 16,7% e do M60 ao M90 um aumento de 14,3%.

O paciente 3 no M0 apresentou um score clínico de 13, no M30 de 10, no M60 de 8 e no M90 de 9. Exibiu uma diminuição do M0 ao M30 de 23,1%, do M30 ao M60 de 20% e do M60 ao M90 apresentou um aumento de 12,5%.

O paciente 4 no M0 apresentou um score clínico de 10, no M30 de 7, no M60 de 6 e no M90 de 6. Exibiu uma diminuição do M0 ao M30 de 30%, do M30 ao M60 de 14,3% e do M60 ao M90 não apresentou diminuição.

O paciente 5 no M0 apresentou um score clínico de 13, no M30 de 9, no M60 de 8 e no M90 de 8. Exibiu uma diminuição do M0 ao M30 de 30,7%, do M30 ao M60 de 11,1% e do M60 ao M90 não apresentou diminuição.

O paciente 6 no M0 apresentou um score clínico de 16, no M30 de 12, no M60 de 9 e no M90 de 11. Exibiu uma diminuição do M0 ao M30 de 25%, do M30 ao M60 de 25% e do M60 ao M90 apresentou um aumento de 22,2%.

Após quatro semanas de tratamento no momento 30 (M30), os animais tiveram persistência das dermatopatias e linfadenomegalias 100% (6/6). Dentre os sinais clínicos persistentes, tem-se: mucosas hipocoradas 16,67% (1/6), condição corporal magra 50% (3/6), dor nas articulações 16,67% (1/6), alopecia e/ou dermatite descamativa 83,33% (5/6), dermatite ulcerativa 50% (3/6), dermatite nodular 16,67% (1/6) e onicogrifose 50% (3/6).

No M60 os cães tiveram persistência dos sinais clínicos como dermatopatias e linfadenomegalias 100% (6/6), hiporexia 16,67% (1/6), condição corporal magra 50% (3/6), mucosas hipocoradas 16,67% (1/6), alopecia 66,67% (4/6), dermatite

descamativa e/ou ulcerativa 50% (3/6), onigrifose 33,33% (2/6) e estado de ânimo apático 33,33% (2/6).

No M90 os cães tiveram persistência dos sinais clínicos como dermatopatias e linfadenomegalias 100% (6/6), hiporexia 16,67% (1/6), condição corporal magra 50% (3/6), mucosas hipocoradas 33,33% (2/6), alopecia 50% (3/6), dermatite descamativa 66,67% (4/6), dermatite ulcerativa 50% (3/6), dermatite nodular 16,67% (1/6), onigrifose 50% (3/6) e estado de ânimo apático 50% (3/6). (Tabela 1)

Tabela 1.- Frequência dos sinais clínicos observados nos animais com infecção natural por *L. infantum* no M0, M30, M60 e M90

Sinais clínicos	M0	M30	M60	M90
Diminuição do apetite	50%	-	16,67%	16,67%
Condição corporal magra	50%	50%	50%	50%
Linfadenomegalia	100%	100%	100%	100%
Mucosas hipocoradas	66,67%	16,67%	16,67%	33,33%
Dor nas articulações	33,33%	16,67%	-	-
Alopecia	83,33%	83,33%	66,67%	50%
Dermatite descamativa	83,33%	83,33%	50%	66,67%
D. ulcerativa	66,67%	50%	50%	50%
D. nodular	33,33%	16,67%	-	-
Onicogrifose	66,67%	50%	33,33%	50%
Estado anímico	100%	16,67%	33,33%	50%

Estatisticamente, na avaliação dos escores clínicos não tiveram diferenças significativas entre o momento zero e as datas após o tratamento com o TAP-04.

Avaliações hematológicas

Os resultados observados no momento zero (M0), revelaram que o 83,33% (4/6) apresentaram anemia, 33,33% (2/6) do tipo normocítica normocromica, 16,67%

(1/6) microcítica normocromica e 33,33% (2/6) macrocítica normocromica. 83,33% (5/6) apresentaram leucopenia, linfopenia o 66,67% (4/6), neutropenia 33,33% (2/6), eosinofilia 16,67% (1/6), plaquetopenia 50% (3/6) e o 83,33% (5/6) apresentaram hiperproteinemia.

Nos momentos M30, M60 e M90 os resultados obtidos não apresentaram uma melhoria evidente. As alterações hematológicas dos pacientes são apresentadas nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7

Tabela 2.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 1 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Hemácias	5350000	5800000	5630000	7180000
Hematócrito	35,4%	40,6%	38,8%	39%
Hemoglobina	11,68	13,4	12,8	12,9
Plaquetas	366400	460600	679300	600000
Leucócitos	10500	8500	11100	12400
Neutrófilos	8715	7395	8658	9920
Linfócitos	630	170	1554	992
Monócitos	105	510	444	496
Eosinófilos	1050	425	444	620
PPT	8,8	9	9,2	9,2

Tabela 3.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 2 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Hemácias	5800000	5180000	4260000	5080000
Hematócrito	30,8%	28,8%	28,3%	31,3%
Hemoglobina	10,2	9,5	9,3	10,3
Plaquetas	255200	183000	229300	196400
Leucócitos	5400	8000	4400	5600
Neutrófilos	4968	6400	3828	4760
Linfócitos	432	1040	308	672
Monócitos	0	240	220	112
Eosinófilos	0	320	44	56
PPT	8,4	7,6	7,2	7,6

Tabela 4.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 3 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Hemácias	2770000	3210000	4010000	3780000
Hematócrito	23,7%	23,2%	26,9%	25,4%
Hemoglobina	7,8	7,7	8,9	8,4
Plaquetas	100000	72300	100000	89800
Leucócitos	3950	11400	11700	12400
Neutrófilos	2054	7524	9009	10292
Linfócitos	1264	3306	2106	992
Monócitos	119	456	117	496
Eosinófilos	514	114	468	620

PPT	10	9,2	9	8,2
-----	----	-----	---	-----

Tabela 5.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 4 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Hemácias	6100000	6300000	6860000	6666000
Hematócrito	40,7%	43,6%	45%	42%
Hemoglobina	13,4	14,4	14,9	13,9
Plaquetas	219600	198400	171000	156000
Leucócitos	8000	6700	11500	11400
Neutrófilos	4960	4757	7820	8892
Linfócitos	1840	1340	1955	1596
Monócitos	320	268	575	570
Eosinófilos	880	335	575	342
PPT	8,8	9	9,2	8,6

Tabela 6.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 5 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Hemácias	2580000	4830000	4680000	5210000
Hematócrito	25%	28,6%	27,3%	26%
Hemoglobina	8,3	9,4	9	8,6
Plaquetas	143500	447000	112300	417200
Leucócitos	7700	10600	4200	6900
Neutrófilos	5621	8268	3444	5175
Linfócitos	1232	212	168	1035

Monócitos	77	106	0	138
Eosinófilos	693	2014	0	552
PPT	12	12	14	14

Tabela 7.- Alterações hematológicas nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 6 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Hemácias	3930000	4050000	3650000	4430000
Hematócrito	24,6%	19,2%	26,9%	30%
Hemoglobina	8,1	6,3	8,9	9,9
Plaquetas	83000	146800	68900	221600
Leucócitos	3400	3900	5400	8000
Neutrófilos	2584	2730	4482	5840
Linfócitos	408	780	486	1680
Monócitos	204	78	270	320
Eosinófilos	204	312	162	160
PPT	7,8	7,6	8	8,4

Avaliações bioquímicas

No M0 o 83,33% (5/6) dos cães avaliados apresentaram hiperproteinemia (valores acima de 7,1gr/dL), 100% apresentaram hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. 33,33% (2/6) apresentaram AST aumentado e 16,67% (1/6) ALT aumentado.

A evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 se apresenta nas tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e 13.

Tabela 8.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 1 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Uréia	50	22,3	37,1	54
Creatinina	0,88	0,82	0,91	1,21
AST	39,6	55,1	48,4	47,4
ALT	37,6	30,5	34	33,5
Fosfatase alcalina	23	56	65	45
Gamma Glutamil Transferase	0,95	3,41	3,5	1,25
Proteínas totais	7,73	7,37	7,54	9,97
Albumina	2,74	2,59	2,65	3,22
Globulina	4,99	4,78	4,89	6,75

Tabela 9.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 2 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Uréia	44,5	37,8	34,4	24,2
Creatinina	0,58	0,62	0,51	0,55
AST	106,7	82	92,7	116,5
ALT	45,1	58,1	136	313,3
Fosfatase alcalina	148	167,8	666,77	786,78
Gamma Glutamil Transferase	4,39	6,14	15,81	19,61
Proteínas totais	7,87	6,84	6,07	6,44
Albumina	2,33	2,09	1,93	2,07
Globulina	5,54	4,75	4,14	4,37

Tabela 10.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 3 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Uréia	28,4	30,4	26,2	45,2
Creatinina	0,72	0,79	0,62	0,5
AST	89,2	127,9	115,1	202,9
ALT	102,1	141,7	172,9	238,9
Fosfatase alcalina	104	146,9	147,78	267,3
Gamma Glutamil Transferase	2,67	4,78	2,32	5,7
Proteínas totais	8,69	8,75	8,34	13,69
Albumina	1,63	1,57	1,71	2,93
Globulina	7,06	7,18	6,63	10,76

Tabela 11.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 4 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Uréia	27,7	29,5	37,6	38,5
Creatinina	0,79	0,77	0,99	1,2
AST	67,4	70,1	94,7	94,5
ALT	38,1	41,9	42,3	44,5
Fosfatase alcalina	45,89	36,3	37,3	39,6
Gamma Glutamil Transferase	3,45	1,94	1	1
Proteínas totais	8,26	8,42	9,73	9,45
Albumina	2,35	2,42	2,87	2,32
Globulina	5,91	6	6,86	7,13

Tabela 12.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 5 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Uréia	21	28,3	31,9	21,4
Creatinina	0,81	0,88	0,76	0,77
AST	43,9	53,1	37,7	46,6
ALT	16,8	24,3	13,7	15,8
Fosfatase alcalina	47,9	45,7	44,81	61,09
Gamma Glutamil Transferase	1,92	1,46	0,54	1,88
Proteínas totais	11,93	12,04	11,89	12,5
Albumina	1,75	2,04	1,97	2,21
Globulina	10,18	10	9,92	10,29

Tabela 13.- Evolução dos parâmetros bioquímicos nos momentos M0, M30, M60 e M90 do paciente 6 com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04.

Variável	M0	M30	M60	M90
Uréia	151,1	53,9	72,5	77,1
Creatinina	1,47	0,67	0,65	0,71
AST	218	248,3	190,8	302,2
ALT	310,1	360,6	506,5	756,3
Fosfatase alcalina	134,2	367,4	889,59	1369,68
Gamma Glutamil Transferase	3,41	8,55	7,87	19,88
Proteínas totais	6,32	6,65	6,44	7,24
Albumina	1,34	1,48	1,48	1,72
Globulina	4,98	5,17	4,96	5,52

Carga parasitaria

No M0 foi detectado DNA do parasito em 100% (6/6) dos animais, a média da carga parasitaria foi 14,06 fg. As cargas parasitarias de cada animal nos momentos M30, M60 e M90 se apresentam na tabela 4.

Tabela 14.- Carga parasitaria dos animais com infecção natural por *L. infantum* submetidos ao tratamento experimental com o TAP – 04 nos momentos M0, M30, M60 e M90.

Animal	M0	M30	M60	M90
1	0,95 fg	-	-	-
2	3,72 fg	28,21 fg	14,27 fg	392,17 fg
3	58,05 fg	79,75 fg	14,27 fg	144,29 fg
4	2,13 fg	-	-	8,82 fg
5	2,27 fg	119,37 fg	282,49 fg	187, 21 fg
6	17,26 fg	0,59 fg	17,41 fg	7,51 fg

Discussão

Com os dados obtidos podemos observar que a LVC apresenta uma ampla variedade de sinais clínicos, os quais podem classificar os animais infectados em oligossintomático ou polissintomáticos (DANTAS-TORRES et al., 2010; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014) e que seu aparecimento dependente de muitos fatores como a capacidade do sistema imune do hospedeiro para controlar a enfermidade, a patogenicidade e carga parasitaria assim como concomitantes (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017;).

No início do tratamento, todos os animais apresentavam linfadenomegalias e dermatopatias, sinais clínicos que estão presentes na maioria dos cães infetados (NOLI; AUXILIA, 2005; GREENE, 2015). As dermatopatias demostram que se tem comprimento da derme, epiderme e hipoderme devido na presença do parasito (TORRECILHA et al., 2016; ORDEIX et al., 2017).

Em função da sintomatologia clínica não ser patognomônica, o diagnóstico deve ser realizado juntamente com os testes hematológicos, bioquímicos além de testes sorológicos e/ou moleculares (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; PESSOA-E-SILVA et al., 2019).

Em relação na melhora clínica dos cães, a melhora dos escores clínicos aconteceu nos cães 1, 3, 4, 5 e 6 do início do tratamento até o M60, no cão 2 a melhora foi até o M30, no M90 todos os animais aumentaram os scores mas nenhum aumentou os escores até o escore que tinham no M0. Nos cães 1 e 2 exibem uma melhora dos escores clínicos parecida aos estudos feitos com o antimoníato de meglumina e miltefosina, no dia 42 tiveram uma melhora nos escores clínicos de 51,1% para a miltefosina e 63,4% para o antimoníato de meglumina (MATEO et al., 2009) em comparação ao 50% do cão 1 e 52,4 % do cão 2 que encontramos em nosso experimento após 30 dias.

Para o M90 todos os cães tiveram um aumento dos escores, entre as causas prováveis podemos pressupor que os animais se re-infetaram ou que a concentração do TAP-04 no organismo dos cães não é suficiente para o controle dos parasitos, sendo que estes tiveram uma diminuição e o posterior aumento.

Enquanto as alterações hematológicas, a anemia foi encontrada em 83,33% dos cães e é concordante aos achados de Nicolato., et al (2013), que demonstra que a anemia é uma das alterações que é encontrada nos animais em maior quantidade. O tipo de anemia mais comum é a não regenerativa normocítica normocromica, (RIBEIRO et al., 2018). Isto sugere que a causa pode ser uma inflamação crônica e/ou a falha da eritropoiese devido aos câmbios que acomete o parasito na medula óssea (MO) e/ou nos rins (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018).

Após o início do tratamento não houve melhora marcada na anemia dos cães, isto devido a cronicidade da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2011), mas se contrapõe aos resultados Woerly et al., (2009) que achou um número substancial de animais que normalizaram seus valores hematológicos após o uso de miltefosina.

As alterações na série branca foram leucopenias achadas em um 83,33% ao início do tratamento, entre as líneas leucocitárias, a linfopenia foi a alteração mais comum isto pode ser porque os linfócitos migram aos linfonodos para construir a resposta inflamatória que ocorre tipicamente em LVC (NICOLATO et al., 2013; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

Ao longo do estudo não se encontrou algum padrão na fórmula leucocitária o que demonstram que a infecção por *Leishmania* sp não tem um padrão de leucograma específico (NICOLATO et al., 2013; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018), mesmo assim o controle clínico patológico durante o tratamento da doença é importante para ter uma ideia da prognose (MIRÓ et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A alteração bioquímica mais frequente ao início do estudo foi a proteinemia encontrado em um 83,33% , hipoalbuminemia 100%, hiperglobulinemia 100% e o ratio A/G baixo no 100%, achados que concordam com a maioria dos estudos (WOERLY et al., 2009; NICOLATO et al., 2013; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

As alterações clínico patológicas se mantiverem durante todo o tratamento, tendo uma ligeira melhoria nos primeiros 60 dias mas para o dia 90, a maioria destas alterações empioraram, isto tem relação com a carga parasitaria, a qual diminuiu nos primeiros 60 dias y para o dia 90 aumentou, ao igual que os sinais clínicos.

Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o TAP-04 na dose de 1mg/kg uma vez na semana por doze semanas via oral como um medicamento promissório para o tratamento da LVC, sendo que utilizado a uma dose baixa mostrou que controlou a doença, embora não tivesse uma melhora clínica e clínico patológica melhor.

Recomendamos seguir com os estudos deste composto para encontrar a melhor dose que tenha melhores resultados na remissão de sinais clínicos e clínico patológicos.

Referências bibliográficas

- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. P324-330, 2008.
- CARDOSO, M. V. D. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 48–59, 30 out. 2014.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 313–317, 2010.
- DE PAIVA CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of Leishmania infantum DNA in canine blood. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 356–358, nov. 2009.
- GREENE. **Infectious Diseases of the Dog and Cat 4th Edition**. 4th. ed. [s.l: s.n.]. v. 1
- HARVEY, J. W. et al. **Veterinary Hematology**. [s.l: s.n.].
- HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. **Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis** **Parasitology**, 2017.
- MATEO, M. et al. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. **Parasitology Research**, v. 105, n. 1, p. 155–162, 2009.
- MELÉNDEZ-LAZO, A. et al. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with Leishmania infantum: Comparison of five different clinical classification systems. **Research in Veterinary Science**, v. 117, n. August 2016, p. 18–27, 2018.
- MIRÓ, G. et al. **Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two** **Trends in Parasitology**, 2008. Disponível em: <<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1471-4922%2808%2900157-8>>. Acesso em: 6 set. 2018
- NAVA-ZUAZO, C. et al. 2-Acylamino-5-nitro-1,3-thiazoles: Preparation and in vitro bioevaluation against four neglected protozoan parasites. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1626–1633, 1 mar. 2014.

NAVARRETE-VAZQUEZ, G. et al. Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: A comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 10, p. 3168–3171, 15 maio 2011.

NICOLATO, R. D. C. et al. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. **Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: A systematic review***Veterinary Dermatology*, ago. 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*, 2014.

ORDEIX, L. et al. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, 2017.

RIBEIRO, R. R. et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, n. C1, 2018.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

SMELT, S. C. et al. B Cell-Deficient Mice Are Highly Resistant to *Leishmania donovani* Infection, but Develop Neutrophil-Mediated Tissue Pathology. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3681–3688, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

TORRECILHA, R. B. P. et al. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 132, p. 83–87, 2016.

VASCONCELOS GOMES DE OLIVEIRA, V. **Aspectos relacionados à transmissão e à atividade biológica de tiazóis sobre *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)**. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2017.

VIANA, K. F. et al. Therapeutic vaccine of killed *Leishmania amazonensis* plus saponin reduced parasite burden in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*.

Veterinary Parasitology, v. 254, n. March, p. 98–104, 2018.

WOERLY, V. et al. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitology Research**, v. 105, n. 2, p. 463–469, 2009.