



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

PAULO ROBERTO SOARES DE GOES FILHO

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE PARASITARIA NA PELE INTEGRA E
NIVEIS SERICOS DE VITAMINA D EM CÃES COM INFECCAO
NATURAL POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO COM TIAZOACETILPIRIDINA – 04**

Recife

2020

PAULO ROBERTO SOARES DE GOES FILHO

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE PARASITARIA NA PELE INTEGRA E
NIVEIS SERICOS DE VITAMINA D EM CÃES COM INFECCAO
NATURAL POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO COM TIAZOACETILPIRIDINA – 04**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva
Junior

Recife

2020

PAULO ROBERTO SOARES DE GOES FILHO

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE PARASITARIA NA PELE INTEGRA E
NIVEIS SERICOS DE VITAMINA D EM CÃES COM INFECCAO
NATURAL POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO COM TIAZOACETILPIRIDINA – 04**

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) (Presidente)

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira

UNINASSAU

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Dra. Lorena A. V. S. Costa

Medica Veterinaria – Universidade Federal Rural de Pernambuco
(UFRPE)

Recife, 28 de fevereiro de 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)

G598a GOES FILHO, PAULO ROBERTO SOARES DE
AVALIAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA NA PELE ÍNTEGRA E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA
D EM CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS AO TRATAMENTO
COM TIAZOACETILPIRIDINA – 04 / PAULO ROBERTO SOARES DE GOES FILHO. - 2020.
83 f. : il.

Orientador: VALDEMIRO AMARO DA SILVA JÚNIOR.
Inclui referências e apêndice(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal, Recife, 2020.

1. leishmaniose visceral canina. 2. tiazoacetilpiridina 04. 3. vitamina D. 4. pele. I. JÚNIOR, VALDEMIRO
AMARO DA SILVA, orient. II. Título

CDD 636.089

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a natureza pela vida e toda sua beleza.

Agradeço a todos que me ensinaram o interesse e valorização do conhecimento. Me delongarei um pouco pois me parece que este é o momento de deixar registrado.

Começo, mais uma vez pelos meus Pais.

À minha mãe Claudia pela abnegação e pelo exemplo de firmeza e coragem, hoje como homem adulto não conheço muitas pessoas corajosas e realmente honestas como ela, parece simples, mas sustentar a palavra sob qualquer circunstância é uma característica raríssima, a ela que não se curva a comodidades agradeço, e torço que os covardes que agora brandem não se aproveitem você. Agradeço mãe por sempre permitir que eu pudesse ir atrás da minha curiosidade.

Ao meu pai Paulo também pela abnegação e honestidade mais acima de tudo pela eterna paciência e amor. Também com um raríssimo, talvez exclusivo, dom: conseguir ensinar a felicidade a outra pessoa, obrigado, eu não seria feliz se não tivesse lhe conhecido. Agradeço por sempre me estimular ao estudo e me cobrar disciplina quando necessário, por sua cobrança passei por momentos da minha formação acadêmica que não gostei, graças a ela agora posso estudar o que me dá na telha, obrigado.

Tive sorte também pelos meus avós, pessoas de extrema riqueza afetiva e intelectual, todos eles estimularam minha imaginação e busca pelo conhecimento. Já que não posso mais dizer isso a eles deixo aqui registrado meu agradecimento e minha sorte de tê-los comigo. Meu avó Luiz Gois pelas histórias que despertavam curiosidade pelo mundo e pela vida. Meu avô Paulo Gouveia, um transmissor do interesse pela ficção científica, pelo amor, coesão e participação na vida em família (a palavra família não teria o mesmo significado para mim sem você). A minha avó Irene pela capacidade de agregar os netos e todos a sua volta. A minha vó Maria do Carmo que partiu durante esse doutorado, obrigado por me entreter e ser a pessoa que fazia o que eu pedisse, me ajudar nas tarefas escolares, sempre vou lembrar do seu bolo e seu filhiz.

Tenho que agradecer a minha esposa Ana Carolina Giusti, que ouviu várias vezes que não haveria pagina de agradecimento nesta tese, obrigado pelo amor “raiz” e pela sua abnegação, nunca vou esquecer que você largou sua faculdade e seus interesses para eu terminar este doutorado. Obrigado por estar no mesmo projeto que eu sempre, sua linda.

À minha filha Maria Júlia agradeço por ser esta obrigação maravilhosa que me dá energia, por você busco sempre o melhor.

À Maria Teresa, minha filha, nascida no doutorado, agradeço pelo sorriso.

À minha Irmã Isabel por estar na casa dos meus pais nestes momentos de tormenta que passamos nos últimos anos dando, talvez, a atenção que eu já não consigo dar. Estendo assim este agradecimento ao meu cunhado Gabriel.

Aos meus primos, ótimos companheiros, em especial os mais próximos Nana, Silvinho, Ricardinho e Luísa.

Aos colaboradores do antigo projeto de doutorado e de minha formação acadêmica, o Prof. Marcelo W. Teixeira, o Prof. Ricardo Yara e Profa. Claudia S. A. Lima.

Ao amigo e orientador Prof. Valdemiro Amaro a Silva Júnior, que é o grande propulsor da minha vida acadêmica na UFRPE, me orientou na monitoria, iniciação científica, mestrado e não me deixou desistir do doutorado. Obrigado por sempre ajudar.

Ao Prof. Lêucio Câmara Alves.

À minha *alma mater* UFRPE por ser a instituição que me permitiu uma sólida formação acadêmica, e obrigado a todos que fazem parte dela e sempre me receberam muito bem em todos esses anos. Obrigado também pelo seu viés social, tive amigos na casa do estudante, bolsistas de permanência e testemunhei a ruptura do ciclo de exclusão social pela chegada de um diploma universitário em uma família.

Ao programa de Pós-Graduação Biociência Animal pela sua excelência e a todos os diretores ao longo da minha permanência (Prof. Evêncio, Valdemiro, Rinaldo e Ana Porto) pela competência e fraternidade.

À FACEPE.

Aos colegas do laboratório, em especial Jacilene pelo exemplo de força.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias, em especial aos residentes.

Ao amigo Eiji Nakasone pelo empenho no nosso trabalho.

A todos que contribuíram com minha formação, desde o Colégio São João até o momento.

Neste momento histórico tão difícil que o Brasil atravessa, não poderia deixar de agradecer as pessoas pobres e excluídas deste país que mesmo sem ter acesso a uma formação como a minha, pagaram pela minha formação. E espero poder retribuir. E por extensão a todos que lutam pelo fim da desigualdade social.

Aos cães que participaram do experimento.

RESUMO

Na busca por um novo fármaco para o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC), doença que dispõe de poucas opções terapêuticas, este trabalho buscou avaliar o efeito de uma nova droga, a tiazacetilpiridina – 04 (TAP-04) para tratamento de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Foram utilizados 6 cães sintomáticos de idades entre 2 e 7 anos de ambos os sexos e diferentes raças recebendo por 90 dias, uma vez por semana, a dose de 1 mg/Kg por via oral de TAP-04. Aos dias 0, 30, 60, 90 do tratamento foram coletadas amostras de sangue para monitoramento de parâmetros hematológicos, bioquímicos e dosagens de vitamina D assim como biópsias de pele íntegra. Foram utilizadas técnicas de histologia convencional para avaliar o padrão inflamatório e sua intensidade e a imuno-histoquímica para marcar e contar as formas amastigotas. Os fragmentos de pele coletados aos dias 0, 30, 60 e 90 de tratamento foram processados para histopatologia e para a imunohistoquímica (IHQ). Na histopatologia foi usada a coloração HE para observação do padrão inflamatório e bem como classificar em leve, moderada e intensa a inflamação. Na IHQ foi confirmada a positividade dos fragmentos bem como a contagem de formas amastigotas por campo de maior aumento. Na contagem de amastigotas foi atribuído um escore de 0 a 3 para as amostras. Como resultado encontramos um infiltrado linfocitário histiocitário, em alguns casos difuso em outros apenas perifolicular, com presença de inflamação em todos os momentos do tratamento. Quanto a contagem de amastigotas não houve redução no parasitismo na pele. Este é o primeiro trabalho a utilizar o TAP-04 para tratamento da LVC.

Palavras-chave: Leishmaniose, cão, tiazacetilpiridinas, vitamina D, TAP-04, pele.

ABSTRACT

In the search for a new drug for the treatment of canine leishmaniasis (CanL), a disease orphan of treatments, this work sought to evaluate the effect of a new and promising drug TAP - 04 for the treatment of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Six symptomatic dogs aged 2 to 7 years of both sexes and different breeds were used, receiving a dose of 1 mg / kg orally of TAP-04 for 90 days, once a week, On days 0, 30, 60, 90 of the treatment, blood samples were collected to monitor hematological, biochemical and vitamin D levels, as well as biopsies of intact skin. On day 0, the animals showed low levels of vitamin D and, on average, did not change significantly during the treatment, with a positive correlation between the values and the clinical condition. It is also concluded that in the dose used, TAP-04 is well tolerated by the animals and it is not possible to attribute undesirable effects to the treatment. On parasitism on the skin of animals being treated. Conventional histology techniques were used to assess the inflammatory pattern and its intensity and immunohistochemistry to mark and count amastigote forms. The skin fragments collected on days 0, 30.60 and 90 of treatment were processed for histopathology and for immunohistochemistry (IHC). Histopathology used HE staining to visualize the inflammatory pattern and to classify inflammation as mild, moderate and intense. In the IHQ, the positivity of the fragments was confirmed, as well as the count of amastigote forms per field of greatest increase. The amastigote count was assigned a score of 0 to 3 for the samples. As a result, we found a histioplasmocytic lymphatic infiltrate, a diffuse time just a peripheral time at all times of the treatment and when the amastigotes count there is no reduction in skin parasitism. This is the first work to use TAP-04 to treat CanL.

Keywords: Leishmaniasis, dog, thiazoacetylpyridines, vitamin D, TAP-04, Skin.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
2.	REVISÃO DE LITERATURA	
2.1.	Leishmaniose Visceral Canina	11
2.2.	Agente etiológico, vetor e transmissão.....	11
2.3	Imunopatogenia e Sinais Clínicos.....	13
2.4	Alterações hematológicas e bioquímicas.....	16
2.5	Alterações Dermatológicas.....	18
3.	Diagnóstico.....	19
3.1	Diagnóstico parasitológico.....	20
3.2	Diagnóstico sorológico.....	20
3.3	Diagnóstico molecular.....	21
4	Tratamento.....	24
4.1	Antimoniais Pentavalentes.....	26
4.2	Alopurinol	26
4.3	Domperidona.....	27
4.4	Miltefosina	27
4.5	Anfotericina B	28
4.6	Marbofloxacin	29
4.7	Outros fármacos.....	30
4.8	Tiazoacetilpiridina 04 (TAP-04).....	32
5	Vitamina D e Leishmaniose Visceral Canina.....	33
6	OBJETIVOS	34
7	Referências	35

CAPÍTULO I – “short communication”

CORRELAÇÃO POTENCIAL ENTRE OS NÍVEIS DO METABÓLITO CIRCULANTE ESTÁVEL DA VITAMINA D (25-HIDROXIVITAMINA D; 25 (OH) D) E AO STATUS CLÍNICO E PARASITOLÓGICO DE CÃES SINTOMÁTICOS NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum*.47

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO PARASITISMO NA PELE INTEGRA DE CÃES INFECTADOS POR *Leishmania infantum* TRATADOS COM TIAZOACETILPIRIDINA – 0459

Apendice.....69

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é causada pela espécie *Leishmania Infantum* sendo em cães sintomáticos uma patologia imunologicamente caracterizada por altas concentrações séricas de imunoglobulinas e baixa resposta imunológica celular (MAIA e CAMPINO, 2008).

Os cães acometidos ainda tem grande importância na saúde pública visto que são os principais reservatórios urbanos da leishmaniose visceral (DINIZ et al., 2008), doença transmitida a mamíferos susceptíveis por flebotomíneos durante o repasto sanguíneo (GUIMARÃES-E-SILVA et al. 2017).

Os sinais clínicos na LVC são linfadenomegalia, perda de peso, intolerância ao exercício, letargia, poliúria, epistaxe, onicogribose, debilidade, vômito e diarreia (MIRÓ et al., 2008). Nos exames complementares observam-se proteinúria, hipoalbuminemia, trombocitopenia, anemia, alteração das enzimas hepáticas como também alterações nos indicadores de função renal (MIRÓ et al., 2008).

Recentemente baixos níveis séricos de Vitamina D tem sido considerados como fatores de risco para a LVC, visto que a 25-hidroxi vitamina D tem reconhecido papel imunomodulador, fortalecendo a imunidade inata induzindo a expressão de peptídeos antimicrobianos (LIU et al., 2017), (SCHOTT e HANCOCK. 2000), aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio, modulando a expressão de citocinas e induzindo a fagocitose (JO, 2010). Especificamente a vitamina D reduz a produção de citocinas derivadas de linfócitos Th1 e Th17, a diferenciação de linfócitos B e da secreção de IgG. (CHEN et al., 2007).

Atualmente, são utilizadas drogas na terapia da LVC que possuem princípios ativos contra *Leishmania sp.*, moduladores do sistema imunitário (imunossupressores e imunoestimulantes) e medicamentos de apoio para controlar as complicações secundárias à doença (OLIVEIRA et al., 2017).

Porém no Brasil a única droga liberada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é a miltefosina, liberada em 2016 para o tratamento da LVC, atendendo à portaria interministerial 1.426, de 11 de julho de 2008 que proíbe o uso de medicamentos para o tratamento de LVC que sejam de uso humano e não sejam registrados (MAPA, 2008).

Buscando contornar as reações adversas e o custo do tratamento da LVC no Brasil foram feitos novos estudos os quais mostraram a efetividade dos tiazóis, especificamente da tiazacetilpiridina 04 (TAP – 04) que apresentou as maiores taxas de inibição da viabilidade das formas amastigotas no interior do macrófago em um experimento *in vitro* com outros tiazóis de sua categoria (OLIVEIRA, 2017).

As manifestações dermatológicas estão dentre as mais importantes na LVC, ocorrendo o parasitismo na pele de cães sintomáticos ou assintomáticos. (MADEIRA et al, 2009). Sendo justificativa importante para manutenção da endemia nas regiões acometidas (OIE, 2018). A biopsia de pele foi usada neste trabalho como indicador da efetividade de tratamento e parâmetro a ser associado a outros achados clínicos, bioquímicos e hematológicos.

Diante da baixa disponibilidade de opções terapêuticas para o tratamento da LVC este trabalho busca avaliar o efeito do tratamento com tiazacetilpiridina (TAP-04) frente à infecção natural por *L. Infantum*, e investigar a relação da concentração sérica de vitamina D com o curso clínico da doença nos animais tratados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença crônica, sistêmica e imunomediada de caráter zoonótico, causada por *L. infantum* (ABBASZADEH-AFSHAR et al., 2015; SOLANO-GALLEGO et al., 2017). A depender da resposta imune, o período de incubação pode variar de três meses a sete anos, o que leva a diferentes apresentações clínicas da doença (GENARO, 1993; SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

2.2 Agente etiológico, vetor e transmissão

O agente etiológico da LV é um protozoário pertencente à ordem Trypanosomatida, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*, sendo conhecidas aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* sendo 31 espécies parasitas de mamíferos e 20 espécies patogênicas para humanos (AKHOUNDI et al., 2016).

O principal modo de transmissão do parasito para o hospedeiros mamíferos é por picada de fêmeas de insetos hematófagos da subfamília Phlebotominae (GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2017), sendo o *Lutzomyia longipalpis* (LOPES et al., 2017), *Lutzomyia migonei* no estado de Pernambuco e *Lutzomyia cruzi* nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (PITAPEREIRA et al., 2008). O ciclo biológico é do tipo heteroxeno, com participação de dois hospedeiros, o flebotomíneo, que apresenta a forma

promastigota no seu intestino, e um hospedeiro definitivo mamífero, que possui a forma ovoide não móvel, denominada de amastigota (KASPER et al., 2015).

A infecção do vetor ocorre quando a fêmea faz o repasto sanguíneo num hospedeiro infectado ingerindo as formas amastigotas de *Leishmania spp* existentes no interior dos macrófagos. No inseto, as amastigotas se reproduzem por divisão binária, transformam-se em promastigota, e estas se multiplicam rapidamente até originarem as promastigotas metacíclicas infectantes (BRASIL, 2014).

No hospedeiro, após o repasto sanguíneo do vetor, as formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, e se diferenciam em formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Os macrófagos, repletos desta últimas, rompem-se liberando essas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo (PALTRINIERI et al., 2010).

Outras formas de transmissão podem ocorrer, como por vetores alternativos, transfusão sanguínea, sexual e vertical (OLIVEIRA et al., 2017).

Mamíferos pertencentes à família *Canidae*, principalmente o cão doméstico, são apontados com a principal fonte de infecção para os flebotomíneos em ambiente urbano, pela alta prevalência da doença nesta espécie e grande quantidade de parasitos na pele, tornando-os alvo principal para o controle da doença (DANTASTORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; GUIMARAES et al., 2017).

Os felinos também pode ser acometidos com ocorrência em várias partes do mundo (COELHO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015; METZDORF, 2015). Estão envolvidos ainda no ambiente urbano os roedores (gêneros *Oryzomys* e *Akodon*), gambás (*Didelphis marsupialis*, *Didelphis albiventris*), além do cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*), preguiça-de-dois-dedos (*Chloepus didactylus*), tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*), raposas (*Dusicyon vetuluse*, *Cerdocyon thous*), quirópteros (*Desmodus rotundus*) e primatas não humanos (*Callithrix penicillata*, *Callithrix jacchus*) (CUNHA et al., 2014; CARDOSO et al., 2015; PAIZ et al., 2015; CALDART et al., 2017; PAIZ et al., 2018).

2.3. Imunopatogenia e Sinais Clínicos

As formas promastigotas metacíclicas ao serem depositadas no organismo são aderidas e recrutadas por células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente macrófagos, dando início a uma série de eventos (REIS et al., 2006). Numa infecção por *L. infantum*, as células do sistema mononuclear fagocitário infectadas atuam como células apresentadoras de antígenos, estimulando os linfócitos (CD4+) T auxiliares do tipo 1 (Th1), ou T auxiliares do tipo 2 (Th2). Quando o antígeno é apresentado por moléculas do complexo maior de histocompatibilidade do tipo II, elas liberam linfocinas que regulam o potencial microbicida dos macrófagos (REIS et al., 2006). As células Th1 são consideradas pró-inflamatórias e secretam principalmente as interleucinas-2 (IL-2) e 12 (IL-12), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon γ (IFN- γ), que podem iniciar a imunidade celular mediada e citotoxicidade (REIS et al., 2006). Há fortes evidências que células TCD8+ citotóxicas também estão envolvidas na resistência à doença (PINELLI et al., 1995).

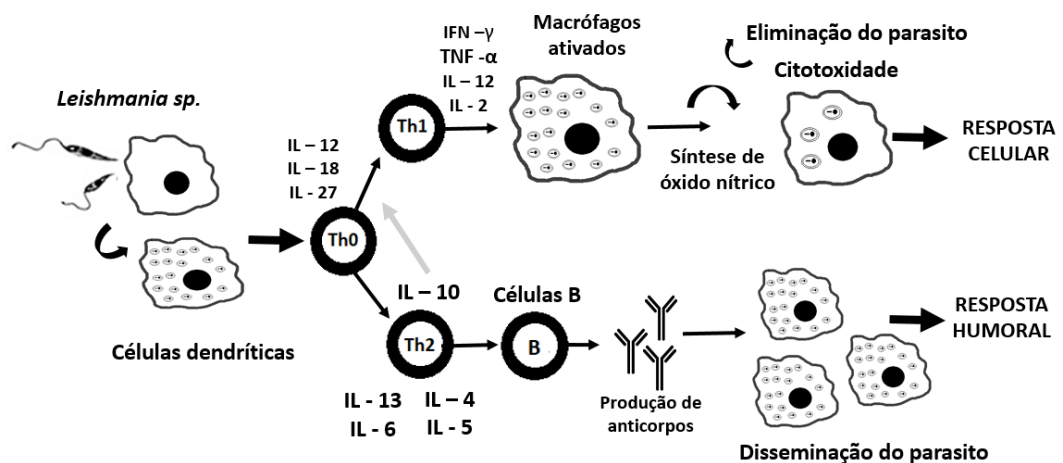
O eixo Th2 media a imunidade humoral com produção exacerbada de anticorpos e é considerada anti-inflamatória, secretando principalmente as interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13 e apresenta comportamento antagonista das células Th1 (GENARO, 1993; FERRER, 2002). *Leishmania sp* é capaz de direcionar a diferenciação de células T para uma resposta predominantemente do tipo Th2, caracterizada pela persistência da infecção (REIS et al., 2006).

Os animais que desenvolvem sinais clínicos, apresentam uma diminuição de células TCD4+ Th1 e aumento de TCD4+ Th2, produzindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, promovendo proliferação de células B e consequentemente, produção de grande quantidade de anticorpos (PINELLI et al., 1994, 1999). Esses anticorpos não protegem e, muitas vezes são

prejudiciais, pois formam imunocomplexos que se depositam nas membranas basais de diversos órgãos (SLAPPENDEL, 1988; MARTINEZ-MORENO et al., 1995). Desta forma, as citocinas produzidas pelas células Th, a depender da resposta imunológica do hospedeiro, poderão ativar mecanismos que resultam tanto em proteção, quanto na exacerbação da doença (PINELLI et al., 1999).

A figura 1 ilustra resumidamente a resposta imune e seus eixos frente ao parasito.

Figura 1 - Resposta imune celular na infecção por *Leishmania infantum*. Retirado de Nascimento (2019).



O número e a intensidade dos sinais clínicos são determinados por um conjunto de fatores que envolvem a cepa do parasito, genética e o estado imunológico do hospedeiro (FERRER, 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Desta forma, o sistema imunológico dos cães é capaz de controlar a infecção durante vários anos, sem o aparecimento de sinais, e às vezes pode até evoluir para uma cura espontânea (SOLANO-GALLEGO et al., 2017). Por outro lado,

alguns cães infectados podem evoluir para síndromes graves levando os animais ao óbito (RIBEIRO et al., 2018). De acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, os animais podem ser classificados em assintomáticos ou sintomáticos (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010) sendo que os assintomáticos representam importante papel como reservatório da doença (BARBIÉRI, 2006).

Os animais assintomáticos respondem por 20 a 40% do total de soropositivos, sendo que destes, cerca de 80% irão desenvolver a doença (MORETTI et al., 1995).

A doença pode ainda ser classificada como aguda, subaguda ou crônica, de acordo com o quadro evolutivo, sendo as formas subaguda e aguda raras em comparação à forma crônica, apresentando uma evolução entre 3 a 4 semanas e 2 a 3 meses, respectivamente (CAMPILLO et al., 1999)

Os sinais clínicos são bastantes variáveis e inespecíficos, sendo os mais predominantes as dermatopatias, que incluem dermatite esfoliativa, papular, nodular e ulcerativa, além de alopecia e onicogribose, sendo a dermatite descamativa a alteração mais comum, reportada entre 56 a 91% dos casos (SOLANO-GALLEGO et al., 2017; NOLI e AUXILIA, 2005; PALTRINIERI et al., 2016).

No entanto, os cães podem apresentar sinais sistêmicos que incluem problemas articulares, linfadenomegalia, oftalmopatias, epítaxes, vômitos, diarreias e comprometimento renal, apontado como a principal causa de óbitos em cães com LV (FERRER, 2002; MIRÓ et al., 2008). O sistema hemolinfático é o primeiro envolvido e é caracterizado por linfadenomegalia com aspecto inicial exsudativo evoluindo para proliferativo hiperplásico (LUVIZOTTO, 2006).

As alterações oftálmicas mais observadas são blefarites, ceratoconjuntiva seca ou não, uveítes, conjuntivites folicular ou membranosa (SILVA, 2007; NOGUEIRA, 2007). Essas alterações são ocasionadas pela decorrência de infiltrado linfoplasmocitário perivascular em resposta a infecção presença do protozoário (FERRER, 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Além da perda de peso, a atrofia muscular pode estar presente, relacionada à necrose das fibras musculares decorrente do processo inflamatório crônico

(SILVA, 2007; NOGUEIRA, 2007).

A multiplicação de parasitos no organismo animal, particularmente nos hepatócitos pode induzir alterações estruturais e, conseqüentemente desencadear hepatomegalia e hepatite difusa crônica (SILVA, 2007; NOGUEIRA, 2007). A doença renal pode ser atribuída pela deposição de imunocomplexos ou presença do parasito nas membranas glomerulares (MIRÓ et al., 2008; SOLANOGALLEGO et al., 2011). Entretanto, há evidências que a resposta imune celular também esteja envolvida na patogênese da nefropatia da doença (COSTA et al., 2000).

2.4 Alterações hematológicas e bioquímicas

As alterações mais comuns incluem azotemia, proteinúria, hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, trombocitopenia, anemias, leucocitose ou leucopenia e aumento dos valores das enzimas hepáticas (GÓMEZ-OCHOA et al., 2010; MENDONÇA et al., 2015; BANETH et al., 2018, TORRECILHA et al., 2016).

No hemograma, a anemia com normocitose, normocromia e arregeneração tem sido mais relatada em cães com infecção natural, podendo ser explicada por perda sanguínea na epistaxe e ulcerações da pele, eritrólise, inflamação generalizada e doença renal crônica (SILVA, 2007; MENDONÇA et al., 2015; TORRECILHA et al., 2016). Por outro lado, independentemente da presença de vários ou nenhum sinal clínico de LV nos animais, há alterações significativas no hematócrito e hemoglobina (COSTA-VAL et al., 2007).

A trombocitopenia é outro achado frequente, sendo causada pela destruição periférica imunomediada das plaquetas circulantes, vasculite, trombocitopoiiese alterada e aumento da destruição plaquetária após falência renal e/ou hepático (MOURA et al., 2002; CORTESE et al., 2009; CORTESE et al., 2011) podendo ser encontrada em 15% a 50% nos animais infectados (CIARAMELLA et al., 2005; COSTA-VAL et al., 2007).

Quanto à série leucocitária, a leucocitose pode estar presente em alguns animais, principalmente por neutrofilia com desvio à esquerda regenerativo,

estando associado a um quadro de infecção bacteriana secundária concomitantemente (MATTOS JR et al., 2004). A linfocitose também tem sido relatada em cães assintomáticos e sintomáticos (FELDMAN et al., 2000; IKEDA-GARCIA et al., 2003), sendo decorrente da estimulação antigênica persistente em infecções crônicas (GROULADE et al., 1977; BARR et al., 1991). Enquanto, a linfopenia está associada à severidade das manifestações clínicas da doença, sendo possivelmente atribuídas à liberação de citocinas imunodepressoras na presença do parasito, além do bloqueio de maturação das linhagens leucocitárias, causada pelo intenso parasitismo da medula óssea e também pelo recrutamento dessas células para sítios inflamatórios (BOURDOISEAU et al., 1997; ALVAR et al., 2004; REIS et al., 2006).

No que concerne às alterações bioquímicas, as alterações renais, representadas pelo aumento das concentrações séricas de ureia e creatinina, são relativamente comuns na LVC (TORRECILHA et al., 2016). A hiperproteinemia nos cães com LV é decorrente de uma resposta imune humoral policlonal de linfócitos B, onde se observa um aumento de gamaglobulina, diminuição de albumina e inversão na relação albumina/globulina, ao qual ocorre em decorrência de perdas por comprometimento hepático e renal ou subnutrição crônica em animais com anorexia (REIS, et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; GREENE, 2012). A hipoalbuminemia é muito comum em cães com a enfermidade, devido à doença hepática crônica (> 60% dos animais tem hipoalbuminemia) e proteinúria (THRALL et al., 2012).

Na LVC, as alterações das enzimas hepáticas estão associadas com a evolução da doença em função da multiplicação do parasito no fígado, principalmente nas células de kupffer (SILVA, 2007; NOGUEIRA, 2007). Há o aumento da Alanina aminotransferase (ALT), enzima de extravasamento que se apresenta livre no citoplasma, principalmente nos hepatócitos, além da fosfatase alcalina (FA) (THRALL et al., 2012).

2.5 Alterações Dermatológicas

A pele canina apresenta grande importância por ser o órgão onde ocorre a primeira interação entre o parasito e o sistema imune canino. A presença de amastigota na pele de canídeos, inclusive de animais assintomáticos, confirma a influência desta espécie na propagação da doença (GIUNCHETTI et al. 2006, QUEIROZ et al. 2010, QUEIROZ et al. 2011).

Dentre as manifestações cutâneas descritas, destaca-se a dermatite esfoliativa seca com descamação excessiva, associada ou não a alopecia ou hipotricose (CIARAMELLA et al. 1997, SARIDOMICHELAKIS 2007). Úlcera, alopecia periorbital ou difusa, dermatite nodular, onicogribose, onicose, pelos secos e opacos também são descritos (CIARAMELLA et al. 1997, PAPADOGIANNAKIS et al, 2005).

Lesões menos comuns, tais como hiperqueratose nasodigital, eritema multiforme, despigmentação, pústulas e paniculite, são relatadas. Dermatites bacterianas secundárias são comuns. (CFSPH, 2009).

Na avaliação dermatohistopatológica destacam-se a hiperqueratose ortoqueratótica, hiperplasia epidérmica, exocitose, crosta, incontinência pigmentar, edema superficial, dermatite nodular, perivascular e intersticial, perifoliculite, dermatite periglandular, adenite sebácea e foliculite (PAPADOGIANNAKIS et al, 2005). O tipo celular inflamatório predominante são os mononucleares, com predominância de macrófagos e linfócitos. Neutrófilos, eosinófilos e mastócitos normalmente são encontrados em menor quantidade (SARIDOMICHELAKIS et al. 2007). Algumas lesões microscópicas, dependendo da sua intensidade, podem ser encontradas tanto em animais com a pele lesionada quanto em pele macroscopicamente hígida (PAPADOGIANNAKIS et al, 2005).

Microscopicamente a inflamação têm um predomínio do tipo histiocítico de intensidade acentuada. A localização histológica predominante foi a peri/intra-anexo, sendo a forma amastigota visualizada em cerca de metade dos casos (CAMARGOS, 2015)

Quanto à intensidade da inflamação, Munford (2016) encontrou

predominância de inflamação moderada e intensa em animais sintomáticos e de discreta a moderada em animais assintomáticos sem encontrar diferenças significativas entre animais sintomáticos e assintomáticos quanto à intensidade de inflamação ($p=1,000$). O infiltrado inflamatório encontrado é predominantemente linfoplasmocitário e linfohistioplasmocitário (MUNDFORD, 2016).

3. Diagnóstico

O diagnóstico da LVC continua sendo um desafio, devido à presença de animais assintomáticos, inespecificidade de sinais clínicos e ausência de um diagnóstico que possua 100% de especificidade e sensibilidade (MOREIRA JR, et al., 2003). Sendo assim, é necessário à realização do diagnóstico laboratorial quer seja por meio de exames laboratoriais parasitológicos, sorológicos e moleculares isolados ou associados (ALVAR et al., 2004; MAIA e CAMPINO, 2012). No entanto o diagnóstico correto pode ser considerado um problema de saúde pública devido à variedade de sinais clínicos e padrões histopatológicos inespecíficos semelhantes a outras enfermidades e à inexistência de um teste diagnóstico com 100% de sensibilidade e especificidade (Ministério da Saúde, 2006). Reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste rápido TR DPP® são exames sorológicos comumente utilizados na triagem de diagnóstico e controle da doença tanto no setor público quanto no privado (ALVAR et al. 2004, SANTIS et al. 2013). Já o diagnóstico parasitológico direto é realizado por meio da observação da forma amastigota encontrada em material biológico oriundo preferencialmente de punção/biópsia hepática, esplênica, de linfonodo, medula óssea e cutânea. Esse tipo de exame apresenta aproximadamente 100% de especificidade

O parasitológico indireto é comumente realizado por meio de técnicas de imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase (ALVAR et al. 2004).

3.1 Diagnóstico parasitológico

O exame parasitológico representa o “Padrão-Ouro” para o diagnóstico definitivo da LVC, e se baseia na visibilidade de formas amastigotas do parasito no interior dos macrófagos ou livres em preparações citológicas, como aspirado de linfonodos, biopsias de medula óssea e citologia esfoliativa da pele (SILVA, 2007; GREENE, 2012). Esse método direto representa o método de eleição para o diagnóstico de infecção estabelecida na enfermidade, por ser rápido, de fácil execução, baixo custo, e possuir 100% de especificidade. Entretanto, a sensibilidade do exame pode ser baixa, devido a alguns fatores como: coleta, experiência do leitor, qualidade da amostra e carga parasitária (GENARO, 1993; SILVA, 2007).

3.2 Diagnóstico sorológico

Os métodos sorológicos detectam a presença de anticorpo IgG anti *Leishmania infantum* e são bastante úteis em inquéritos epidemiológicos (GREENE, 2012). No entanto, esses métodos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e específicos, podendo ocorrer à presença de reações falso-positivas, por outros tripanossomatídeos como o *Trypanosoma caninum* e alguns patógenos prevalentes em algumas regiões do Brasil como a *Babesia spp*, *Ehrlichia spp* e *Anaplasma spp* (RIBEIRO, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; BARROS et al, 2012).

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste rápido TR DPP® são exames sorológicos comumente utilizados na triagem de diagnóstico e controle da doença tanto no setor público quanto no privado (Alvar et al. 2004, Santis et al. 2013).

No Brasil, as técnicas sorológicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da infecção canina é o DPP (Dual Path Platform) – BioManguinhos/Fundação Oswaldo Cruz® como triagem e o ELISA como teste confirmatório (GRIMALDI et al., 2012; BRASIL, 2014).

3.3 Diagnóstico molecular

A biologia molecular tem mostrado ser uma ferramenta de grande valia no diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp com sensibilidade e especificidade próximas a 100%, principalmente para detecções em cães assintomáticos (MAIA e CAMPINO, 2008). A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é um método molecular que permite identificar e amplificar sequências de DNA do parasito, apresentando alta especificidade, porém a sensibilidade pode ser dependente da amostra obtida. Amostras de medula óssea, linfonodos, pele e suabe conjuntival tem mostrado melhores resultados em relação ao sangue periférico, devido á baixa quantidade de parasitos nessa amostra biológica (FERREIRA, 2013). Outra técnica molecular derivada da PCR é a Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR), método baseado no uso de corantes ou sondas fluorescentes e que permite avaliar a carga parasitária na pele (MAIA e CAMPINO, 2008). No quadro 1 estão listadas algumas vantagens e desvantagens das técnicas de diagnóstico.

QUADRO 1- Vantagens e desvantagens das técnicas de diagnostico para LVC. Traduzido de SOLANO-GALLEGO et al, 2011.

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
SOROLOGIA	• Determinação do nível de anticorpos que é essencial para o diagnóstico e estabelecimento de um prognóstico	• Não detecta a presença real do parasita <i>Leishmania</i> • Reações cruzadas com outros tripanossomos

TESTE RÁPIDO	• Teste clínico rápido	• Fornece apenas resultados positivos ou negativos • Sensibilidades variáveis e desempenho com risco de falsos negativos • Um resultado positivo precisa ser avaliado por uma sorologia quantitativa
QUANTITATIVO (RIFI, ELISA)	Determina o nível de anticorpos • Altos níveis de anticorpos na presença de sinais clínicos compatíveis e / ou anomalias clínico-patológicas são conclusivos de leishmaniose clínica	• O desempenho e a precisão do ponto de corte dependerão do laboratório • Diferenças entre laboratórios e baixa padronização de técnicas • Baixos níveis de anticorpos exigirão mais análises
CITOLOGIA / HISTOPATOLOGIA	Permite a detecção direta do próprio parasita e do tipo de achados patológicos: - Achados patológicos suspeitos de infecção - Permite a exclusão de outros diagnósticos diferenciais - Rápido e não invasivo (citologia)	• Baixa sensibilidade para a detecção de <i>formas</i> amastigotas de <i>Leishmania</i> em tecidos ou fluidos corporais • Requer a realização de outros testes de diagnóstico, como imunohistoquímica e / ou PCR, quando os parasitas não são visualizados • Não revela o estado imunológico do cão • Requer experiência
PCR	• Permite a detecção de DNA de leishmania • Alta sensibilidade (kDNA) e especificidade • Quantificação da carga parasitária (se PCR em tempo real)	• Resultados falsos positivos possíveis devido à contaminação de DNA • Diferentes padronizações e técnicas usadas por diferentes laboratórios de diagnóstico • Não revela o estado imunológico • Não pode ser realizado como a única técnica diagnóstica para a confirmação da doença porque um resultado positivo confirma a infecção por <i>Leishmania</i>, mas não doença

CULTURA DE PARASITA

- Permite o isolamento de parasitas *Leishmania*
- Facilita a identificação isoenzimática do parasita
- Técnica de diagnóstico demorada e trabalhosa
- Pode levar um mês para fornecer um resultado
- Realizada apenas em laboratórios de pesquisa

4. Tratamento

O tratamento da LVC é um grande desafio visto o pequeno número de drogas existentes, a toxicidade do tratamento e a persistência da infecção além da condição clínica do paciente (IKEDA-GARCIA et al., 2007).

O tratamento é necessário não só para o melhora do paciente como também a infectividade canina, diminuindo assim os riscos epidemiológicos para humanos e outros cães não infectados (ALVAR, et. al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; TRAVI et al., 2018).

A terapia anti-leishmanial pode diminuir a carga parasitária, embora não seja capaz de alcançar uma cura parasitológica (BANETH e SHAW, 2002; NOLI e AUXILIA, 2005; MANNA et al., 2008; REGUERA et al., 2016). Desta forma, o tratamento da doença objetiva a remissão dos sinais clínicos e redução na capacidade infectante dos animais (GOMEZ-OCHOA et al., 2009; CIARLINI et al., 2010; TRIGO et al., 2010; TRAVI, et al., 2018) e tem sido baseado na utilização de antimoníato de meglumina, anfotericina B, alopurinol, miltefosina e imunomoduladores (SOLANO-GALEGO et al., 2009).

Contudo, no Brasil o tratamento da LVC consolidou-se apenas no ano de 2016, sob a portaria interministerial do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ao qual autorizou o uso de Miltefosina, agente antiprotózoário com ação leishmanicida (MAPA, 2016). O alvo de ação das drogas e seus efeitos sobre o paciente estão resumidos no quadro 2.

QUADRO 2: Alvo das drogas usadas no tratamento da LVC sobre o parasito e/ou sobre o hospedeiro e efeito do TAP-04.

FARMACO	AÇÃO		REFERÊNCIA
	Parasito	Hospedeiro	
Antimoniato de Meglumina	Leishmanicida, inibição da fosfofrutoquinase	Cardio e hepatotoxicidade Nefrotoxicidade	SOLANO-GALLEGO et al., 2009 SOLANO-GALEGO et al, 2011
Anfotericina B	Leishmanicida, permeabilidade de membrana por ligação a ergosterol	Nefrotoxicidade	SUNDAR et al, 2007
Alopurinol	Síntese proteica- RNA	Urolitíase	NOLI e SARIDOMICHELAKIS, 2014 SOLANO-GALLEGO et al, 2011
Miltefosina	Leishmanicida	Sinalização de membrana, apoptose, estimula INF e ON Vômito e diarreia	MANNA et al., 2008; REGUERA et al., 2016
Domperidona		Imunomodulador, Th1 e suas citocinas	GOMEZ-OCHOA et al., 2009
TAP - 04	QUELANTE DE PROTEASES (CISTEINO-	MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLOGICA,	OLIVEIRA, 2017

4.1 Antimoniais Pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes são usados há mais de 50 anos para o tratamento da LV (TIUMAN et al., 2011) e atuam seletivamente, inibindo a enzima fosfofrutoquinase dos protozoários, que é necessária para a oxidação de ácido glicolítico e ácidos graxos, causando sua morte (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Em países em que os antimoniais pentavalentes são permitidos para cães a dose recomendada para é de 75 a 100 mg/ kg por via subcutânea uma vez ao dia por quatro a seis semanas (BRASIL, 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). A monoterapia com o uso de antimonio promove remissão dos sinais clínicos, com baixas recidivas, mas não elimina completamente os parasitos (DENEROLLE e BOURDOISEAU, 1999; BANETH e SHAW, 2002; ALVAR, 2004; IKEDA-GARCIA et al., 2010). Assim, recomenda-se o uso do antimonio de meglumina em associação com o alopurinol, sendo a terapia mais eficaz e rotineira no protocolo da LVC (MANNA et al., 2015). Além disso, o fármaco apresenta efeitos colaterais como cardiotoxicidade, pancreatite e nefrotoxicidade (LAWN et al., 2006; BADALOV et al., 2007; SUNDAR e CHAKRAVARTY, 2015), porém em cães não foram observados sinais de pancreatite (PANAGIOTIS et al., 2014).

Este fármaco é amplamente usado, sucedendo o tártaro emético introduzido por Evandro Chagas, para o tratamento da leishmaniose e o primeiro fármaco a ter casos de resistência descritos, induzidas por utilização de sub-dosagem em humanos (CHARKRAVARTY E SUNDAR, 2010).

4.2 Alopurinol

O alopurinol é uma droga leishmanioestática que atua como um análogo de purina, inibindo síntese proteica quando incorporada ao RNA do parasito, levando-o a morte (NOLI e SARIDOMICHELAKIS, 2014). É utilizada como monoterapia em alguns países, onde o antimonio e a miltefosina estão indisponíveis (HELM et al., 2013). Como terapia associada a uma droga leishmanicida, esse fármaco representa o composto mais usado contra o LVC

na Europa (MATTIN et al., 2014), induzindo remissão dos sinais clínicos e baixa toxicidade (RIBEIRO, 2007). Porém, é incapaz de eliminar completamente os parasitos e não tem atividade preventiva na LVC (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005). A dose utilizada como monoterapia é de 15-30 mg/kg/dia dividido em duas ou três doses diárias (NOLI e AUXILIA, 2005) e a interrupção do tratamento pode ocorrer quando as seguintes condições forem satisfeitas: recuperação clínica completa; normalização clínico-patológica e níveis de anticorpos negativos ou abaixo do nível de corte do teste. Por isso, é necessário realizar controles da resposta do organismo ao tratamento e melhora clínica (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

O alopurinol associado à domperidona e três doses de vacina contra *Leishmania sp.* com intervalo de 21 dias, induziu gradativamente a remissão dos sinais clínicos, e após doze meses de tratamento não foram encontradas formas amastigotas de *L. infantum* na pele dos animais (NASCIMENTO, 2015).

4.3 Domperidona

A imunomodulação é essencial para o tratamento da LVC, tendo a domperidona como importante fármaco para essa finalidade (PASSOS et al., 2014). Essa droga é um antagonista do receptor de dopamina e provoca a liberação de serotonina, estimulando produção de prolactina e produção de linfócitos Th1 e de IL2, IL-12, INF- γ e TNF- α , levando à ativação dos macrófagos seguida da diminuição da população de Th2 (GOMEZ-OCHOA et al., 2009). Em estudo realizado por Gomez-Ochoa et al (2009) a domperidona em monoterapia foi administrada duas vezes por dia, na dosagem de 1 mg/kg durante 30 dias em cães naturalmente infectados com LVC e a remissão clínica foi observada em 96% dos cães num intervalo de 90 dias.

4.4 Miltefosina

A miltefosina é um alquifosfolípideo, originalmente desenvolvido como agente antineoplásico (HILGARD et al., 1993), com capacidade leishmanicida

in vitro e *in vivo* (SUNDAR et al., 1998; FARCA et al., 2012). Seu mecanismo não está totalmente esclarecido, estudos mostram que o fármaco altera as vias de sinalização e a síntese de membrana celular levando a apoptose (VERMA e DEY, 2004). Além disso, a miltefosina é capaz de estimular células T elevando os níveis de INF- γ , assim estimulando a produção de óxido nítrico (NO) e radicais reativos de oxigênio dentro dos vacúolos dos macrófagos, eliminando os parasitos (MANNA et al., 2008; REGUERA et al., 2016). Quando usado como monoterapia, reduz consideravelmente a carga parasitária, e promove cura clínica (MANNA et al., 2008; ANDRADE et al., 2011). Por outro lado, animais tratados apresentam aumento significativo na parasitemia seis meses após o tratamento (ANDRADE et al., 2011). Por esse fato, é recomendável associar a medicação com outros fármacos para uma melhor resposta terapêutica (MANNA et al., 2015; REGUERA et al., 2016). A associação com o alopurinol na dose 10mg/Kg/dia e miltefosina na dose de 2mg/kg/dia tem sido um protocolo que apresenta a mesma efetividade da associação alopurinol e antimonial pentavalente (MANNA et al., 2015; REGUERA et al., 2016).

4.5 Anfotericina B

A anfotericina B é uma droga com atividade anti-leishmanial efetiva contra diferentes espécies de *Leishmania spp.* que têm relevância clínica nas Américas, tais como *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (MORAIS-TEIXEIRA et al., 2014). Seu mecanismo de ação se dá através da ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática da Leishmania, que altera a permeabilidade de membrana e causa distúrbios metabólicos, culminando com a morte celular (RAMOS et al., 1996; BRASIL, 2014).

Para caninos, a anfotericina B pode ser utilizada pela via intravenosa na dose de 0,5-0,8 mg/kg, duas a três vezes por semana numa dosagem de 10-15 mg/kg (GRAMICCIA et al., 1992). Seu uso na terapia da LVC tem uma boa resposta, porém só é recomendado em áreas não endêmicas, devido a preocupações com efeitos colaterais e indução de resistências em casos

humanos (BEST et al., 2014). A principal limitação ao uso desta droga é a necessidade de hospitalização prolongada devido à sua alta nefrotoxicidade (SUNDAR et al., 2007). A anfotericina B pode ainda afetar a qualidade do sêmen e fertilidade em cães, interferindo com a espermatogênese (ASSIS et al., 2010).

4.6 Marbofloxacin

É uma fluoroquinolona sintética de terceira geração desenvolvida apenas para uso veterinário (ROUGIER et al., 2008). Possui atividade potente contra várias bactérias sendo frequentemente usado no tratamento de uma ampla gama de infecções bacterianas por Gram-positivas e Gram-negativas (PRESCOTT et al., 2000; MEUNIER et al., 2004). Como outras quinolonas, a marbofloxacin inibe a enzima bacteriana DNA girase (ou topoisomerase II), e como a *Leishmania* apresenta uma estrutura genômica que exhibe maiores semelhanças com as bactérias, esse fármaco atua também sobre a DNA girase do parasito (SLUNT et al., 1996; CHAKRABORTY e PRESCOTT et al., 2000). As fluoroquinolonas são conhecidas por apresentarem propriedades imunomoduladoras, diminuindo a resposta das citocinas em particular (DALHOFF e SHALIT, 2003). Estudos demonstram que a marbofloxacin tem previamente uma atividade leishmanicida indireta através do TNF- α e Óxido nítrico (NO) via sintase (VOULDOUKIS et al., 2006). A dose recomendada é de 2mg/kg/dia durante 28 dias, com a qual 83% dos cães apresentaram boa resposta com diminuição dos sinais clínicos (ROUGIER et al., 2008), além da redução da carga parasitária nos linfonodos após três meses. Esse fármaco, também tem mostrado bons resultados in vitro (VOULDOUKIS et al., 2006).

Segundo Rougier et al (2012) a eficácia foi demonstrada em 68,9% do cães, sendo que 23,8% foram clinicamente curados após três meses, além disso a evolução dos parâmetros hematológicos e bioquímicos foram satisfatórios. A recaída foi observada em 52,6% dos cães com aproximadamente 5,5 meses após a conclusão do tratamento. Contudo, não apresentou cura parasitológica com persistência do parasito nos linfonodos

(ROUGIER et al., 2012).

No estudo realizado por Pineda et al (2017), pacientes com LVC e insuficiência renal crônica tratados com marbofloxacin na dose recomendada, apresentaram diminuição na carga parasitária em 72% dos cães, além disso houve aumento da concentração de albumina plasmática e uma diminuição significativa na concentração de globulina. Apesar desse fármaco não eliminar totalmente o parasito, como é o caso de outras drogas com ação leishmanicida seu uso mostrou bons resultados e não induz modificações na ureia e creatinina em cães não azotemicos, sendo uma droga muito segura para pacientes com doença renal crônica (PINEDA et al., 2017). Além disso, apresenta poucos ou nenhum efeito colateral no trato gastrointestinal, incluindo o fármaco como opção promissora no tratamento da LVC (ROUGIER et al., 2012).

4.7 Outros fármacos

Outros fármacos também podem ser utilizados na terapia da LVC, como o metronidazol, que é um antibiótico sintético do nitroimidazol. Segundo Pennisi et al (2005), o metronidazol associado com a espiramicina no tratamento da LVC, apresentou bons resultados com remissão clínica completa ou quase completa. Outros estudos mostram que as recidivas são altas e que a carga parasitária não é eliminada efetivamente (BIANCIARDI et al., 2004).

Vários medicamentos antifúngicos com ação anti-leishmanial foram investigados em humanos, cães e roedores (BANETH e SHAW, 2002). A associação de agentes à base de antimoniais com cetoconazol tem sido utilizada com sucesso em humanos contra a leishmaniose no velho mundo (EL-SAYED e ANWAR, 2010). Essa associação foi investigada *in vitro* contra amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (NUNES et al., 2017). Há um grande interesse em terapias anti-leishmanial de uso oral, sendo o fluconazol, cetoconazol e itraconazol alternativas que satisfazem este requisito (GALVÃO et al., 2017). Estes agentes demonstraram ser altamente eficaz contra *Leishmania* spp tanto em testes *in vitro* (BEACH et al., 1988; SHOKRI et al.,

2017) quanto *in vivo* (SAENZ et al., 1990; ALRAJHI et al., 2002). Entretanto, não há estudos suficientes para recomendar o uso dessas drogas unicamente como terapia antileishmanial (GALVÃO et al., 2017).

O tratamento com pentamidina tem sido utilizado com sucesso para estabelecer a resposta imunológica de cães com LV (LASRI et al., 2003). Estudos mostraram que a pentamidina reduz os sinais clínicos, sem recidivas no período de seis meses após a conclusão do tratamento e sem presença de efeitos colaterais (RHALEM et al., 1999). Um estudo piloto com a aminosidina investigou a eficácia e a segurança da administração diária por via subcutânea de aminosidina na dose de 15 mg/kg durante 21 dias em cães sem azotemia ou proteinúria (ATHANASIOU et al., 2013). Os 30 parâmetros clínicos, sorológicos e parasitológicos melhoraram significativamente no final do tratamento, sem recaída durante os 3 meses subsequentes (ATHANASIOU et al., 2013). No quadro 2 encontram-se os protocolos terapêuticos mais usados no tratamento da LVC e no quadro 3 os alvos terapêuticos conhecidos das drogas usadas e efeitos adversos

Quadro 3: Protocolos terapêuticos usados no tratamento da LVC, adaptado de SOLLANO-GALLEGO et al, 2011.

Drogas	Dosagens	
Antimoniato de meglumina *	75-100 mg / kg uma vez ao dia ou 40-75 mg / kg duas vezes ao dia durante 4 semanas, SC **	* Registrado para uso veterinário na maioria dos países europeus; ambos os medicamentos são comumente recomendados em combinação com alopurinol. VO: via oral; SC: subcutâneo ** O prolongamento do tratamento por 2-3 semanas pode ser considerado se a melhora do paciente for insuficiente.
Miltefosina *	2 mg / kg / uma vez ao dia por 28 dias VO	
Alopurinol	10 mg / kg duas vezes ao dia por pelo menos 6-12 meses VO	

4.8. Tiazoacetilpiridina 04 (TAP-04)

Compostos detentores dos grupamentos piridina e tiossemicarbazona são amplamente estudados como fármacos antitumorais devido à propriedade quelante extremamente favorecida. Entretanto, a pesquisa das piridinas como agentes tripanocidas e leishmanicidas ainda é pouco explorada (CARDOSO et al., 2014).

Baseado nos resultados obtidos na ciclização da tiossemicarbazona em tiazol, a série dos tiazóis foi expandida, explorando o anel piridina para poder delimitar a importância de cada grupo funcional para a atividade tripanocida (CARDOSO et al., 2014). Moléculas que possuem o núcleo piridina tem mostrado ser promissor devido ao amplo espectro de atividades biológicas concernentes (KEENAN et al., 2012) e a alta capacidade de formar quelatos metálicos (PARRILHA et al., 2012).

Vasconcelos (2017) em trabalho *in vitro* avaliou o efeito do TAP-04 (Fig.2) sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* além da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c encontrando promissora atividade leishmanicida e baixa toxicidade a célula hospedeira.

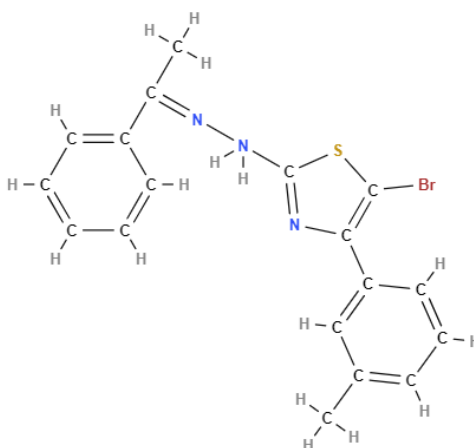


Figura 2: Estrutura química da Tiazoacetilpiridina 04

Fonte: CARDOSO ET AL., (2014). Adaptado.

5. Vitamina D e Leishmaniose Visceral Canina

Fora as funções relacionadas ao metabolismo ósseo e fixação do cálcio sendo precursora do calcitriol a vitamina D é um importante imunomodulador cujo receptor (VDR) é bastante presente em células apresentadoras de antígeno como monócitos, macrófagos e células dentríticas.

A vitamina D é conhecida por modular a resposta imunológica contra patógenos, como por exemplo, a tuberculose, onde fortalece a imunidade inata induzindo a produção de peptídeos antimicrobianos que modulam a expressão de citocinas e aumentam a formação de espécies reativas de oxigênio. (LIU, et al, 2006).

Está demonstrado também o efeito da vitamina D sobre células T e B, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias de Th1 e Th17, diferenciação de células B e secreção de IgG. (RAMOS-MARTÍNEZ et al., 2015).

Em estudo com 68 cães foi relatado que níveis plasmáticos de vitamina d eram significativamente maiores em cães saudáveis (31,8 mg/ml) e em cães doentes assintomáticos (19,6 mg/dL) que em animais doentes e sintomáticos (19,6 mg/mL). Sendo a baixa concentração sérica de vitamina D também considerada como fator de risco para leishmaniose. (RODRIGUES-CORTEZ et al, 2017).

Ramos et al. utilizaram camundongos BALB/c suscetíveis infectados com *L. mexicana* e suplementados com 1,25 (OH) 2D3 para analisar seu efeito no desenvolvimento de lesões de pele. Eles determinaram a expressão in situ de IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ e TGF β nos camundongos infectados e mostram que, o tratamento não afeta a sobrevivência dos parasitas, no entanto, a disseminação de amastigotas é limitada, e a arquitetura celular no tecido é preservada sendo a cura da ferida acelerada (RAMOS et al., 2013).

6. OBJETIVOS

Objetivo Geral

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

Objetivos Específicos

- Avaliar a resposta clínica e laboratorial dos animais naturalmente infectados com *Leishmania infantum* submetidos a tratamento experimental com o composto TAP - 04;
- Dosar a Vitamina D sérica aos dias 0, 30, 60 90 do tratamento.
- Qualificar histologicamente a lesão aos dias 0, 30, 60 90 do tratamento

7. REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH-AFSHAR, M. J. et al. Seroepidemiological survey of visceral leishmaniasis among nomadic tribes of Kerman Province, Southeastern Iran: an observational study for implication to health policy. **Journal of Biostatistics and Epidemiology**, v.1, p.105-111, 2015.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**. 2016 Mar 3;10(3):e0004349. doi: 10.1371/journal.pntd.0004349. Erratum in: PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jun;10(6):e0004770. PMID: 26937644; PMCID: PMC4777430.
- ALEXANDRE-PIRES, G. et al. Canine Leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.137, n. 3-4, p.275-283, 2010.
- ALRAJHI, A. A. et al. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. **New England Journal of Medicine**, v.346, p.891-895, 2002.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p.1-88, 2004.
- 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, p.83-90, 2011.
- ASSIS, V. P. et al. Dogs with *Leishmania chagasi* infection have semen abnormalities that partially revert during 150 days of Allopurinol and Amphotericin B therapy. **Animal Reproduction Science**, v.117, p.183-186, 2010.
- BADALOV, N. et al. Drug-induced acute pancreatitis: an evidence-based review. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.5, p.648-661, 2007.
- BANETH, G. et al. Renal dialysis and long-term treatment of a dog with kidney disease associated with canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v.11, p.2-5, 2018.
- BANETH, G.; SHAW S. E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.315-324, 2002.
- BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.28, p.329-337, 2006.

BARR, S. C.; GOSSET, K.; KLEI T. R. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observations of trypanosomiasis in dogs with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.954-960, 1991.

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, p.419-423, 2012.

BEACH, D. H. et al. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.31, p.149-162, 1988.

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

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

BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.56, p.345-351, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008**. Disponível em:
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html>
> Acesso em 10 de novembro de 2018.

CALDART, E. T. et al. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.26, p.17-27, 2017.

CARDOSO, R. M. et al. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. **Parasites & Vectors**, v.171, p.2-8, 2015.

CARRILLO, E. MORENO J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.67-70. 2009.

CHAKRABORTY, A. K; MAJUMDER, H. K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania*

donovani. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.152, p. 605-611, 1988.

CIARAMELLA, P. et al. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Journal**, v.169, p.465-467, 2005.

CIARLINI, P. C. et al. Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o Tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v.11, p.369-375, 2010.

COELHO, W. M. D. et al. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)**, v.19, P.256-258, 2010.

COLOMBO, F. A. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v.109, p. 267-274, 2011.

CORRALES. Leishmaniosis canina. Manejo clínico de la leishmaniosis canina Podemos unificar criterios? La leishmaniosis canina 2º parte. Información Veterinaria. **Revista oficial del Consejo general de Colegios Veterinarios de Espana**, p. 44-48, 2005.

CORTESE, L. et al. Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally coinfecting by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Veterinary Journal**, v.188 p.118-121, 2011.

CORTESE, L. et al. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v.164 p.778-782, 2009.

COSTA, F. A. L. et al. CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.1455-1458, 2000.

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

CUNHA, R M. et al. Envolvimento do *Desmodus rotundus* no ciclo epidemiológico das leishmanioses na Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, p.774-781, 2014.

DALHOFF, A., SHALIT, I. Immunomodulatory effects of quinolones. **Lancet Infectious Diseases**, v.3, p. 359-371, 2003.

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

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p.151-156, 2006.

DENEROLLE, P. BOURDOISEAU, G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, p.413-415, 1999.

EL-SAYED, M.; ANWAR, A. E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.24, p.332-40, 2010.

FARCA, A. M. et al. Canine leishmaniosis: In vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v.110, p.2509–2513, 2012.

FELDMAN, B.V. et al. **Schalm's Veterinary Hematology**. Canada: Lippincott Williams & Wilkins, 1344p, 2000.

FERREIRA, S. A. **Avaliação do potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina por PCR**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Parasitologia) Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

FERRER L. **The pathology of canine leishmaniasis**. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Seville, Spain, p.21-24, 2002.

GALVÃO, E. L.; RABELLO, A.; COTA, G.F. Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and metaanalysis. **PLoS ONE**, v.12, p.1-24, 2017.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 220f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GÓMEZ-OCHOA, P. et al. The nitroblue tetrazolium reduction test in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.135-138, 2010.

GÓMEZ-OCHOA, P. et al. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **The Veterinary Journal**, v.179, p. 259-263, 2009.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; ORSINI, S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime®) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.86, p.613-620, 1992.

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4. ed. [s.l.] Elsevier/Saunders, 2012.

GRIMALDI, G. J. 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, p.54-59, 2012.

GROULADE. Canine leishmaniasis. Clinical haematology and biology of leishmaniasis. **Animal Company**, v.12, p.121-128, 1977.

GUIMARAES, A. et al. Serosurvey for canine visceral leishmaniasis in rural and urban areas of the Brazilian Legal Amazon. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 21, p.207-208, 2017.

GUIMARÃES-E-SILVA, A. S. et al. *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLoS One**, v.12, p.1-19, 2017.

HELM, M. et al. Therapy of canine leishmaniosis with allopurinol in imported dogs in a non-endemic area. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v.155, p.559-567, 2013.

HILGARD, P. et al. Alkylphosphocholines: A new class of membrane-active anticancer agents. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.32, p.90-95, 1993.

IKEDA-GARCIA, F. A. et al. Clinical and Parasitological of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimonite and allopurinol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, p.218-223, 2010.

IKEDA-GARCIA, F.A. et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba, São Paulo: estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, v.47, p.42-47, 2003.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY - IRIS. **Staging of CKD**. 2009. Disponível em http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS2009_Staging_CKD.pdf. Acesso em 26/11/2018.

KASPER, L. D. et al. **Harrison's Principles of Internal Medicine 19/E (Vol.1 & Vol.2)**. [s.l.] McGraw-Hill Education, 2015.

KULHS, K. et al. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **Neglected Tropical Diseases**, v.5, p.1-16, 2011.

LASRI, S. et al. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.91, p.13-18, 2003.

LAWN, S. D. et al. Electrocardiographic and biochemical adverse effects of sodium stibogluconate during treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis among returned travelers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100, p.264-269, 2006.

LEES, G. E. Early diagnosis of renal disease and renal failure, v.34, p.867-85, 2004.

LOPES, E. G. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology and Infection**, v.145, p.2436-2444, 2017.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados [abstract]. In: **Anais do I Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina**; Jaboticabal, São Paulo, 2006.

Madeira, M et al. (2009). Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target?. **Research in veterinary science**. 87. 260-2. 10.1016/j.rvsc.2009.03.008.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. **Journal of Tropical Medicine**, v.2012, P.1-8, 2012.

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

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

MANNA, L. et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Journal**, v.182, p.441-445, 2008.

MARCOVAL, J. et al. Cutaneous leishmaniasis associated with anti-tumour necrosis factor- α drugs: an emerging disease. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.42, p.331-334, 2017.

MATTIN, M. J. et al. The frequency and distribution of canine leishmaniosis diagnosed by veterinary practitioners in Europe. **Veterinary Journal**, v.200, p.410-419, 2014.

MATTOS JR, D. G. et al. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.119-122, 2004.

MENDONÇA, et al. Biochemical and hematological changes in dogs naturally infected by *Leishmania (infantum) chagasi*. **Revista Clínica Veterinária**; v.20, p.78-84, 2015.

METZDORF, I.P. **Caracterização molecular de *Leishmania infantum* em felinos domésticos na região Centro-Oeste do Brasil**. Tese de mestrado. Mato Grosso do Sul, 2015.

MEUNIER, D. et al. A seven year survey of susceptibility to marbofloxacin of pathogenic strains isolated from pets. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, p.592-598, 2004.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Nota Técnica No 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa** Nota Técnica. [s.l: s.n.], 2016. Disponível em: <<http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>> Acesso em 05 de novembro de 2018.

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

MIRÓ, G.; VÉLEZ, R. L. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. **Veterinary Parasitology**, v.254, p.151-159, 2018.

MOLINA, R. et al. Infectivity in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene**, v.88, p.491-493, 1994.

MORAIS-TEIXEIRA, E. et al. In vitro interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, p.150-154, 2014.

MOREIRA JR, E. D. et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 4, p. 393-397, 2003.

MOURA, R.O.D. et al. Alterações renais em cães (*Canis familiaris*) soropositivos para leishmaniose: aspectos clínicos, laboratoriais e histopatológicos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, p.61-64, 2002.

NASCIMENTO, G. G. **Avaliação da carga parasitária na pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submetidos a tratamento experimental**. Dissertação (Programa de Pós-

Graduação em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

NASCIMENTO, J. O. **AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS A TERAPIA COM MARBOFLOXACINA ASSOCIADA AO ALOPURINOL.** (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

NOGUEIRA, F. S. **Avaliação clínico-laboratorial de cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral submetidos á terapia com anfotericina B.** [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2007.

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

NOLI, C.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Veterinary Journal**, v.202, p.425-35, 2014.

NUNES, D. C. O. et al. In vitro additive interaction between ketoconazole and antimony against intramacrophage *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. **PLoS ONE**, v.12, p. 1-10, 2017.

OLIVEIRA, T. M. et al. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 220-222, 2015.

OLIVEIRA, V. V. G. ASPECTOS RELACIONADOS À TRANSMISSÃO E À ATIVIDADE BIOLÓGICA DE TIAZÓIS SOBRE *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908). (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

PAIZ, L. M. et al. Antibodies and Molecular Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* in Samples of Free-Ranging Marmosets (Primates: Callitrichidae: *Callithrix* spp.) in an Area of Canine Visceral Leishmaniasis in Southeastern Brazil. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, p.1-6, 2018.

PAIZ, L. M. et al. Serological Evidence of Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Synonym: *Leishmania (Leishmania) chagasi*) in Free-Ranging Wild Mammals in a Nonendemic Region of the State of São Paulo, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.15, p.667-673, 2015.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, p.1184–1191, 2010.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v.45, p.552-578, 2016.

- PANAGIOTIS, X. et al. Prospective evaluation of serum pancreatic lipase immunoreactivity and troponin I concentrations in *Leishmania infantum* infected dogs treated with meglumine antimonate. **Veterinary Parasitology**, v.203; p.326-330, 2014.
- PASSOS, S. R. et al. Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with furazolidone and domperidone. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.44, p.463-465, 2014.
- PENNISI, M.G. et al. Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniasis with a combination of metronidazole and spiramycin. **Veterinary Record**, v.156, p.346–349, 2005.
- PINEDA, C. et al. Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. **PLoS ONE**, v.12, p.1-17, 2017.
- PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica, Basel**, v. 107, p. 66-69, 2008.
- POLZIN, D. J. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.23, p.1-11, 2013.
- PRESCOTT, S. G. et al. **Fluoroquinolones**. In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 3rd ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 315–338, 2000.
- RAMOS, H. et al. Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. **Journal of Membrane Biology**, v.152, p.65–75, 1996.
- REGUERA, R. M. et al. R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.227, p.98-114, 2016.
- 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, p.68-75, 2006.
- REIS, A.B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.112, p.102-116, 2006.
- RHALEM, A. et al. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, p.69-76, 1999.

RIBEIRO, R. R. et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v.2018, p.1-12, 2018.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Revista Clínica Veterinária**, v.71, p.66-76, 2007.

ROSA, J. S. S.; SANTOS, S. I. A.; PEREIRA, D. C. O Acúmulo De Lixo no Aglomerado da Serra: Uma Visão de Comunidades do Entorno do Parque Municipal das Mangabeira. **Revista Sinapse Ambiental**, v.7, p.27-45, 2010.

ROUGIER, S. et al. Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: A pilot study. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.244-254, 2008.

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

SAENZ, R. E.; PAZ, H.; BERMAN, J. D. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Medicine**, v.89, p.147-155, 1990.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.199-205, 2005.

SHOKRI, A. et al. In vitro antileishmanial activity of novel azoles (3-imidazolylflavanones) against promastigote and amastigote stages of *Leishmania major*. **Acta Tropica**, v.167, p.73-78, 2017.

SILVA, C. B.; LIPORONE, F. Deposição Irregular de Resíduos Sólidos Domésticos em Uberlândia: Algumas Considerações. **Revista Eletrônica de Geografia, Uberlândia**, v.2, p.22-35, 2011.

SILVA, S. M. **Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) submetidos a um protocolo terapêutico em uma Clínica Veterinária de Belo Horizonte**. [Dissertação]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007

SILVA, S. M. **Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) submetidos a um protocolo terapêutico em uma Clínica Veterinária de Belo Horizonte**. [Dissertação]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

SLUNT, K. M. et al. Effect of mitonafide analogs on topoisomerase II of *Leishmania chagasi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, p.706-709, 1996.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. **Trends in Parasitology**, v.33, p.706-717, 2017.

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

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasite & Vectors**, v.4, p.1-16, 2011.

SUNDAR, S. et al. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, p.556-561, 2007.

SUNDAR, S. et al. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. **Lancet**, v.352, p.1821-1823, 1998.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.24, p.43-59, 2015.

THRALL, M. A. et al. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. BOOK, Wiley, 2012.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v.15, p.525-532, 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.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.12, p.1-13, 2018.

TREVISAN, D. A. C.; LONARDONI, V. V. C.; DEMARCHI, I. G. Diagnostic methods to cutaneous leishmaniasis detection in domestic dogs and cats. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.90, p.868-872, 2015.

TRIGO, J. et al. Treatment of visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. **Vaccine**, v.28, p.3333-3340, 2010.

VEADO, J. C. C. et al. Uso de cetoanálogo na terapia da insuficiência renal canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online)**, v.54, p.543-545, 2002.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.3010-3015, 2004.

VOULDOUKIS, I. et al. Canine visceral leishmaniasis: comparison of in-vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.137-146, 2006.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v.48, p.851-856, 2014.

World Organization for Animal Health (OIE). 2018. Chapter. 3.1.11 – Leishmaniosis (most recent updates adopted in 2014). In **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, OIE, Paris.

XIMENES, M. F. F. M. et al. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) e leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil – reflexos do ambiente antrópico. **Neotropical Entomology**, v.36, p.128-137, 2007.

CAPÍTULO I

“Short communication”

CORRELAÇÃO POTENCIAL ENTRE OS NÍVEIS DO METABÓLITO CIRCULANTE ESTÁVEL DA VITAMINA D (25-HIDROXIVITAMINA D; 25 (OH) D) E AO STATUS CLÍNICO E PARASITOLÓGICO DE CÃES SINTOMÁTICOS NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum*.

RESUMO

Na busca por entender melhor a relação da vitamina D com a evolução da leishmaniose visceral canina (LVC), este trabalho avaliou as concentrações séricas de 25-hidroxi vitamina D com a progressão da LVC em animais sob tratamento experimental com Tiazoacetilpiridina- 04 (TAP – 04).. Foram utilizados 6 cães naturalmente infectados por *leishmania infantum*, sintomáticos de idades entre 2 e 7 anos, de ambos os sexos e diferentes raças recebendo por 90 dias, uma vez por semana, a dose de 1 mg/Kg por via oral de TAP-04, Aos dias 0, 30, 60, 90 do tratamento foram coletadas amostras sangue para monitoramento de parâmetros hematológicos, bioquímicos e dosagens de 25-hidroxivitamina D. Ao dia 0 os animais apresentaram valores baixos de vitamina D e, em média, não se alteraram significativamente ao longo do tratamento observando-se que a TAP-04 foi bem tolerada pelos animais não sendo possível pelos parâmetros clínicos e laboratoriais avaliados atribuir efeitos indesejados ao tratamento. Concluiu-se também que os animais que apresentavam menores concentrações séricas de 25-hidroxi vitamina D possuíam um pior quadro clínico.

Palavras-chave: Leishmaniose, cão, tiazoacetilpiridinas, vitamina D, TAP-04.

ABSTRACT

In the quest to better understand the relationship of vitamin D with the evolution of canine visceral leishmaniasis (LVC), this study evaluated the serum concentrations of 25-hydroxy vitamin D with the progression of LVC in animals under experimental treatment with Thiazoacetylpyridine-04 (TAP - 04) .. We used 6 dogs naturally infected by *leishmania infantum*, symptomatic between the ages of 2 and 7 years, of both sexes and different breeds receiving a dose of 1 mg / kg orally for 90 days, once a week. of TAP-04, On days 0, 30, 60, 90 of the treatment, blood samples were collected to monitor hematological, biochemical and 25-hydroxyvitamin D dosages. On day 0, the animals showed low levels of vitamin D and, on average , did not change significantly during the treatment, observing that the TAP-04 was well tolerated by the animals and it is not possible due to the clinical and laboratory parameters evaluated to attribute undesirable effects to the treatment. It was also concluded that the animals that presented lower serum concentrations of 25-hydroxy vitamin D had a worse clinical picture.

Keywords: Leishmaniasis, dog, thiazoacetylpyridines, vitamin D, TAP-04.

1. INTRODUÇÃO

No mundo a leishmaniose visceral (LV) é um grave problema de saúde pública com 1,3 milhão de novos casos e 30 mil mortes por ano (WHO, 2018). O cão funciona como reservatório urbano da doença ou como hospedeiro acidental em áreas de incidência da LV (DANTAS-TORRES, 2007), (DEREURE et al, 2000).

Os cães são comumente afetados por *L. infantum*, que causa a doença viscero-cutânea crônica neste hospedeiro chamada leishmaniose visceral canina – LCV (OIE, 2018). A infecção assintomática em cães é generalizada e contribui para manter a presença de longo prazo do parasita em regiões endêmicas (OIE, 2018).

A aparência clínica e evolução da leishmaniose é consequência de complexas interações entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro. O resultado da infecção depende da capacidade dos macrófagos do hospedeiros de efetivamente destruir o parasita (WHO, 2018).

A vitamina D é a precursora do hormônio calcitriol e tem seus efeitos bem descritos na homeostase do cálcio e do fósforo porém vários estudos sugerem fortemente que a vitamina D tem um forte papel imunomodulador desencadeado por sua ligação ao receptor da vitamina D (VDR), que é expresso em várias células apresentadoras de antígenos, como monócitos, macrófagos e células dendríticas (HART et al, 2011), (BAEKE et al, 2010).

Sabe-se que a vitamina D fortalece o sistema imunológico inato, induzindo a expressão de peptídeos antimicrobianos, como catelicidina e β -defensina, nos macrófagos humanos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* (LIU, 2006), (SATO et al, 2013). Esses peptídeos desempenham diversas funções antimicrobianas, agindo diretamente na parede bacteriana (SCOTT e HANCOCK, 2000), aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio, modulando a expressão de citocinas (DANIEL et al., 2008; NIINO et al., 2015) e induzindo a autofagia, outro mecanismo efetivo antimicrobiano relevante (JO, 2010).

Estudos recentes demonstraram um efeito direto da vitamina D nas células T e B, onde reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias derivadas de Th1 e Th17, diferenciação de células B e secreção de IgG (TANG et al.,2017; CHEN et al.,2007). A vitamina D também tem sido associada como fator de risco de uma infinidade de doenças auto-imunes, diabetes, câncer e várias condições infecciosas, como toxoplasmose, influenza, malária e síndrome da imunodeficiência adquirida, leishmaniose visceral humana e na LVC (RODRIGUEZ-CORTES et al. , 2017).

Na busca por fármacos antichagásicos menos tóxicos foi sintetizada a tiazacetilpiridina – 04 (TAP – 04), com boa atividade *in vitro* contra o *Tripanossoma Cruzi* (CARDOSO et al., 2014). Pelo seu potencial contra *T.Cruzi*, outro tripanossomídeo, Oliveira (2017) testou sua atividade leishmanicida *in vitro* bem como sua toxicidade tendo considerado uma promissora droga contra *L. Infantum*.

O objetivo do presente comunicado é relatar a associação entre os níveis séricos de vitamina D estão à progressão da leishmaniose visceral canina (LVC). Para tanto, objetivou-se determinar a correlação potencial entre os níveis do metabólito circulante estável da vitamina D (25-hidroxivitamina D; 25 (OH) D) e ao status clínico e parasitológico de cães sintomáticos naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos Éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA -UFRPE) sob o número: 077/2019 (processo 23082.014246/2019-10).

2.2. Animais utilizados no ensaio clínico e TAP-04.

Foram utilizados 6 animais, domiciliados e atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco positivos para LCV em teste rápido e confirmado por parasitológico de medula óssea. Estes animais positivos foram identificados e anotados seus dados como histórico, nome, sexo, idade, raça, estado nutricional.

Os animais foram tratados com o composto TAP – 04 na dose de 1 mg/Kg em DMSO (1 mL) + 9 mL de água, uma vez por semana por via oral e receberam coleiras repelentes aos flebotomíneos para evitar a reinfeção e como forma de controle da doença. As amostras de sangue foram colhidas aos dias 0, 30, 60 e 90 dias de tratamento para hemograma e bioquímico, bem como dosagem de 25-hidroxi vitamina D.

2.3. 25-hidroxi vitamina D

O metabólito mais ativo da vitamina D (25-hidroxi D₃) foi dosado por imunoensaio competitivo direto de quimioluminescência em amostras de soro protegido da luz e congelado coletados dos animais aos dias 0, 30, 60 e 90.

2.4. Hematologia e Bioquímica

Amostras de sangue foram colhidas em tubos com EDTA para realização de hemograma. A contagem absoluta de hemácias e leucócitos foi

realizada em hemocítômetro e a contagem diferencial em estiraço corado com panóptico rápido.

As dosagens de bioquímica de ASL, AST, uréia, creatinina, albumina, globulina, cálcio e fósforo foram realizadas por bioquímica automatizada em equipamento Bioclin® com kits da mesma marca.

2.5. Análise dos dados

Os valores séricos de vitamina D foram submetidos a o teste de verificação de normalidade (Kolmogorov–Smirnov) pelo programa de análise STATISTICA® (STARSOFT. INC, USA) a comparação entre as semanas de tratamento (D0, D30, D60 E D90) foi feita por análise de variância, ANOVA pelo *software* EXCEL® (Microsoft, USA).

3. RESULTADOS

Como resultado os parâmetros hematológicos e bioquímicos não sofreram poucas alterações, sendo elevação nas concentrações séricas ASL e AST ocorrendo em 3 animais que tiveram piora clínica ao longo do tratamento, portanto não podendo serem atribuídas exclusivamente a uma ação do fármaco testado, podendo serem consideradas esperadas pela patogenia da doença, pelo acompanhamento clínico e laboratorial dos animais fica demonstrada boa tolerância do organismo a TAP-04.

As concentrações séricas de vitamina D encontradas nos dias 0 (D0), 30 (D30), 60 (D60), e 90 dias (D90) do tratamento estão expostas na tabela 1. Considerando como normal a distribuição dos valores e usando a análise de variância para comparar os períodos experimentais (D0, D30, D60 e D90) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as coletas ao longo do tratamento ($p=0,511$). Observou-se que menores concentrações séricas de vitamina D estão relacionadas a um pior quadro clínico e dermatológico (i.e, maior número de lesões ulcerativas).

A calcemia dos animais no período permaneceu dentro dos valores de referência, de 7,6 a 12 m/dL assim como os valores séricos de fosforo entre 2.5 e 5g/dL

TABELA 1: Valores de 25-hidroxi vitamina D nos animais tratados (ng/mL).

Animal	D0	D30	D60	D90
1	11,6	7,7	6,4	21,1
2	4,3	17,1	3,2	5,6
3	8,7	8,8	7,7	8,2
4	9,2	9,1	5,4	7,4
5	15,2	15,8	16,2	10,1
6	17,9	23,3	13,7	13,8
Média±D.P	11,2 ± 4,9 ^(a)	13,6 ± 6,2 ^(a)	8,8 ± 5,1 ^(a)	11,0 ± 5,7 ^(a)

4- DISCUSSÃO

Os animais do experimento se encontravam desde o dia 0 com valores séricos de 25-hidroxi vitamina D abaixo dos valores adotados como referências (20 ng/mL) (FONSECA, 2017) concordando com diversas publicações que também encontraram valores séricos mais baixos em animais infectados, e ainda mais baixo em animais sintomáticos (RODRIGUEZ-CORTES, 2017).

Os valores obtidos nos animais deste experimento antes do tratamento foram 11,2 ± 4,9 ng/mL, sendo possível observar que os animais com concentrações mais baixas de vitamina D estavam com pior estado geral assim como no trabalho de Rodriguez-Cortes et al (2017) que comparou as concentrações séricas de 25-hidroxi vitamina D de 68 cães sendo 50 animais positivos, dentre estes, 35 clinicamente assintomáticos e 15 com sinais clínicos de leishmaniose, encontrando os seguintes valores médios de vitamina D: Negativos 31,8, assintomáticos 29,6 e sintomáticos 19,6, correlacionando os níveis mais baixos de vitamina D com pior estado clínico, sendo os animais deste experimento com concentrações ainda mais baixas.

Em humanos com leishmaniose visceral menores concentrações séricas de vitamina D estão associadas a piores quadros clínicos (KUMAR et al., 2014).

Dentre os animais estudados níveis séricos abaixo de 15 mg/dL estava relacionados com mais lesões ulcerativas enquanto animais com níveis acima deste valor apresentavam consideravelmente menos lesões ulcerativas.

Após o tratamento (90 dias) não houve alteração significativa na concentração sérica de vitamina D, apesar do relato dos proprietários quanto ao melhora da apatia e apetite de todos os animais. Os animais que tiveram desfecho mais favorável neste estudo (considerando cura de lesões ulceradas e crescimento de pelos em áreas de alopecia) foram os dois animais que ao final dos 90 dias apresentavam maior dosagem de vitamina D, concordando com Rodriguez-cortes et al (2017) em seu estudo da associação da vitamina D com a progressão da doença e com Fonseca (2017) que relaciona os valores séricos baixos de vitamina D em cães com uma pior sobrevida em doenças crônicas.

Apesar deste estudo não fazer suplementação de vitamina D sabe-se que o tratamento com esta provocou redução da carga parasitária no baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* tratados com uma associação de vitamina D com ácido retinóico (GOGULAMUDI et al., 2019) concluindo que a elevação da vitamina é favorável à redução da carga parasitária.

Ainda há a possibilidade da interação da molécula de TAP-04 se ligar ao receptor de vitamina D (VDR) pelo seu grupo tiazol induzindo o efeito o 25-hidroxi vitamina D sobre o sistema imunológico em dissociação dos efeitos da vitamina D sobre o metabolismo do cálcio (ROCHEL e MORAS, 2012), sendo necessários mais estudos para confirmar se esse efeito ocorreu e contribuiu nos casos de melhora clínica (N=2).

Os animais que apresentaram elevação da concentração sérica de vitamina D ao longo do tratamento tiveram um desfecho favorável em comparação aos animais que apresentaram níveis baixos persistentes ou queda dos níveis plasmáticos.

5- CONCLUSÃO

Fica demonstrada a associação entre níveis séricos de 25-hidroxi vitamina D mais baixos com casos clínicos mais graves, bem como que animais que apresentaram elevação das concentrações séricas da vitamina ao longo do tratamento com TAP-04 tiveram desfecho favorável.

Os resultados clínicos deste estudo mostram que o TAP-04 na dose de 1 mg/Kg, VO, 1x por semana por 90 dias é bem tolerado pelos animais sem indícios de efeitos indesejáveis e alterações nos parâmetros clínicos, bioquímicos e hematológicos avaliados, com ausência de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, não sendo observada a melhora clínica em 4 dos 6 pacientes.

6- REFERÊNCIAS

- BAEKE F, TAKIISHI T, KORF H, GYSEMANS C, MATHIEU C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 Aug;10(4):482-96. doi: 10.1016/j.coph.2010.04.001. Epub 2010 Apr 27. PMID: 20427238.
- CARDOSO, R. M. et al. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. **Parasites & Vectors**, v.171, p.2-8, 2015.
- CHEN, S. et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J. Immunol*. 179, 1634–47 (2007).
- DANIEL et al. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2008;324:23–33, 2008
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2007.
- Dereure, Jacques & Boni, et al. (2000). Visceral leishmaniasis in Sudan: First identifications of *Leishmania* from dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 94. 154-5. 10.1016/S0035-9203(00)90253-0.
- FONSECA, F. M . Concentração sérica de 25-hidroxivitamina D em cães saudáveis e como fator preditivo e prognóstico em cadelas com neoplasia mamária, Dissertação - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 2017.
- GOGULAMUDI, V.R., DUBEY, M.L., KAUL, D. ET AL. Vitamins (A&D) and Isoprenoid (Chenodeoxycholic acid) molecules are accompanied by Th1 immunostimulatory response and therapeutic cure *in vivo*: possible antileishmanial drugs. *Sci Rep* 9, 8531 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44630-4>
- Hart, P., Gorman, S. & Finlay-Jones, J. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D?. *Nat Rev Immunol* 11, 584–596 (2011). <https://doi.org/10.1038/nri3045>
- Jo, E.-K. (2010), Innate immunity to mycobacteria: vitamin D and autophagy. *Cellular Microbiology*, 12: 1026-1035. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01491.x>

Kumar V., Bimal S., Singh S.K., Chaudhary R., Das S., and Lal C. 2014. *Leishmania donovani*: dynamics of *L. donovani* evasion of innate immune cell attack due to malnutrition in visceral leishmaniasis. *Nutrition*, 30(4): 449–458

Liu PT, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006 Mar 24;311(5768):1770-3. doi: 10.1126/science.1123933. Epub 2006 Feb 23. PMID: 16497887.

Niino M, Sato S, Fukazawa T, Masaki K, Miyazaki Y, Matsuse D, et al. Decreased serum vitamin D levels in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2015 Feb;279:40-5.

World Organization for Animal Health (OIE). 2018. Chapter. 3.1.11 – Leishmaniosis (most recent updates adopted in 2014). In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, OIE, Paris.

OLIVEIRA, V. V. G. ASPECTOS RELACIONADOS À TRANSMISSÃO E À ATIVIDADE BIOLÓGICA DE TIAZÓIS SOBRE *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (Nicolle, 1908). (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017

Espiridión Ramos-Martínez, Laila Gutierrez-Kobeh, and Mónica Irais Villaseñor-Cardoso. The role of vitamin D in the control of *Leishmania* infection. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 93(5): 369-376 - 2015

ROCHEL N, MORAS D. Crystal structure of a vitamin D3 analog, ZK203278, showing dissociated profile. *Anticancer Res*. 2012 Jan;32(1):335-9. PMID:22213324

Rodriguez-Cortes, A., Martori, C., Martinez-Florez, A. et al. Canine Leishmaniasis Progression is Associated with Vitamin D Deficiency. *Sci Rep* 7, 3346 (2017)

CAPÍTULO 2

**AVALIAÇÃO DO PARASITISMO NA PELE INTEGRA DE CÃES
INFECTADOS POR *Leishmania infantum* TRATADOS COM
TIAZOACETILPIRIDINA – 04.**

RESUMO

O tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) busca a cura clínica do animal, especialmente a redução da carga parasitária na pele com o intuito de reduzir o potencial infectante do animal. Neste sentido foi avaliado o efeito da tiazoacetilpiridina 04 (TAP-04), na dose de 1mg/Kg, VO, uma vez por semana, sobre o parasitismo na pele dos animais em tratamento. Foram utilizadas técnicas de histologia convencional para avaliar o padrão inflamatório e sua intensidade e a imuno-histoquímica para marcar e contar as formas amastigotas. Os fragmentos de pele coletados aos dias 0, 30, 60 e 90 de tratamento foram processados para histopatologia e para a imunohistoquímica (IHQ). Na histopatologia foi usada a coloração HE para visualização do padrão inflamatório e bem como classificar em leve, moderada e intensa a inflamação. Na IHQ foi confirmada a positividade dos fragmentos bem como a contagem de formas amastigotas por campo de maior aumento. À contagem de amastigotas foi atribuído um escore de 0 a 3 para as amostras. Como resultado encontramos um infiltrado linfocitário histiocitário, ora difuso ora apenas perifolicular em todos os momentos do tratamento e quanto a contagem de amastigotas não houve redução no parasitismo na pele. Conclui-se que no protocolo utilizado não houve redução do parasitismo em pele. Este é o primeiro trabalho a avaliar o efeito do TAP-04 sobre o parasitismo em pele de cães portadores de LVC.

Palavras-chave: Leishmaniose, cão, tiazoacetilpiridinas, Pele, TAP-04.

ABSTRACT

The treatment of canine visceral leishmaniasis (CanL) seeks the clinical cure of the animal, especially the reduction of the parasitic load on the skin with the intuition to reduce the infectious potential of the dog. In this sense, the effect of thiazoacetylpyridine 04 (TAP-04), at a dose of 1mg / kg, orally, once a week, on skin amastigotes of animals under treatment was evaluated. Conventional histology techniques were used to assess the inflammatory pattern and its intensity and immunohistochemistry to mark and count amastigote forms. The skin fragments collected on days 0, 30, 60 and 90 of treatment were processed for histopathology and for immunohistochemistry (IHC). Histopathology used HE staining to visualize the inflammatory pattern and to classify inflammation as mild, moderate and intense. In the IHQ, the positivity of the fragments was confirmed, as well as the count of amastigote forms per field of greatest increase. The amastigote count was assigned a score of 0 to 3 for the samples. As a result, we found a histioplasmocytic lymphatic infiltrate, a diffuse type just a peripheral type at all times of the treatment and when the amastigotes count there is no reduction in skin parasitism. It is concluded that in the protocol used there was no reduction in skin parasitism. This is the first study to evaluate the effect of TAP-04 on parasitism in the skin of dogs with CanL.

Keywords: Leishmaniasis, dog, thiazoacetylpyridines, skin, TAP-04.

1. INTRODUÇÃO

Sendo uma das mais graves doenças negligenciadas, a leishmaniose visceral que acomete o homem e o cão (LVC) é endêmica em maior parte do Brasil e em várias outras regiões do globo. (QUEIROZ et al., 2011), (OIE, 2018).

Na interação parasito-hospedeiro a pele é cenário de importantes manifestações clínicas e sub-clínicas ocorrendo o parasitismo da pele mesmo em casos assintomáticos (MADEIRA et al., 2009), justificando assim a importância dos cães como reservatório urbano da doença contribuindo para manter a presença de longo prazo do parasita em regiões endêmicas (OIE, 2018).

A pele é também de grande importância por ser o local de interação entre o hospedeiro e o vetor e consequentemente entre o hospedeiro e o parasita. Na LVC o tegumento sofre grandes alterações, sendo o processo inflamatório com infiltrado linfocitoplasmocitário o achado mais frequente (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; QUEIROZ et al., 2011; TOPLU e AYDOGAN, 2011) em 3 padrões histológicos: A dermatite perivascular superficial e profunda, periofolículo granulomatosa e dermatite intersticial (SCOTT et al., 2001).

Para avaliação do parasitismo por *L. infantum* na pele podem ser usadas a histologia convencional e a imunohistoquímica (IHQ) (TAFURI et al., 2004). A histologia convencional no diagnóstico da LVC é limitada pela sua baixa sensibilidade (QUEIROZ et al., 2011) enquanto a IHQ pode oferecer alta sensibilidade (OLIVEIRA, 2017).

Este trabalho investiga o parasitismo na pele de cães naturalmente infectados sob tratamento com tiazacetilpiridina-04 (TAP-04).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos Éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA -UFRPE) sob o número: 077/2019 (processo 23082.014246/2019-10).

2.2. Animais utilizados no ensaio clínico e TAP-04.

Foram utilizados 6 cães domiciliados e atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco positivos para LCV em teste rápido e confirmado por parasitológico de medula óssea. Estes animais positivos foram identificados e anotados seus dados como histórico, nome, sexo, idade, raça, estado nutricional.

Os animais foram tratados com o composto TAP – 04 na dose de 1 mg/Kg em DMSO (1 mL) + água q.s.p 10 mL, uma vez por semana por via oral e receberam coleiras repelentes aos flebotomíneos para evitar a reinfecção e como forma de controle da doença. As amostras de pele íntegra foram colhidas aos 0, 30, 60 e 90 dias de tratamento.

2.3. Histopatologia e Imuno-histoquímica

Fragmentos de pele íntegra da região do cotovelo foram obtidos com um punch de 4 mm, sob bloqueio local com lidocaína a 1%, e fixados em formalina tamponada 10%. Após 24h de fixação, as amostras foram desidratadas,

clarificadas, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo com espessura de 4µm sendo preparada para cada coleta uma lâmina corada com hematoxilina-eosina (HE) (TOLOSA et al., 2003) e outra para imunomarcação.

A imuno-histoquímica (IHQ) pela estreptoavidina-peroxidase foi realizada para a detecção de formas amastigotas no tecido cutâneo através da microscopia óptica segundo técnica descrita por Tafuri et al. (2004). Os cortes foram desparafinizados, hidratados e incubados em peróxido de hidrogênio 4% (30V) em PBS 0,01 M de pH 7,2, seguido pela incubação em leite desnatado para bloqueio de ligações inespecíficas. Soro hiperimune de um cão naturalmente infectado foi utilizado como anticorpo primário (diluição 1: 100) e as amostras foram incubadas em câmara úmida por 18h a 40C. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpos biotinilados de cabra anti-coelho e anti-camundongo (DAKO, Kit-LSAB 2, Califórnia, EUA). Depois, os cortes foram incubados com estreptoavidina-peroxidase (DAKO LSAB 2, Califórnia, EUA) por 20 minutos em temperatura ambiente, seguido pela reação realizada com diaminobenzidina (DAB, DAKO, Kit-LSAB 2, Califórnia, EUA). Finalmente, os cortes foram desidratados, clarificados e contra-corados com hematoxilina de Harris para posterior montagem com lamínula. Seguindo a metodologia usada por Oliveira (2013) atribuímos um escore de 0 a 3 ao numero de formas amastigotas encontradas conforme a tabela 1.

Tabela 1. Intensidade das reações inflamatórias e o comprometimento do órgão avaliado para a variável HE e para a determinação do número de formas amastigotas imunomarcadas através da IHQ.

“Score”	HE	IHQ
0	Nenhuma inflamação	Nenhuma forma amastigota detectada
1	Inflamação discreta	1 – 3 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica
2	Inflamação moderada	4 – 10 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica
3	Inflamação intensa	>10 formas amastigotas por campo de maior amplificação microscópica

2.3. Análise dos dados

A comparação dos escores entre os dias de tratamento (D0, D30, D60 E D90) foi feita por análise de variância, ANOVA pelo software EXCEL®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os cães do experimento ao dia 0 (D0) (6/6) tiveram formas amastigotas marcadas pela IHQ (Figura 1) provando a alta sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica, a partir da utilização da estreptoavidina peroxidase, em animais com diagnóstico parasitológico de LVC, assim como com Ferrer et al. (1991) e Tafuri et al. (2004), os quais relataram que a técnica de imuno-histoquímica possui o valor de diagnóstico definitivo da infecção, conforme afirmaram Xavier et al. (2006) e Oliveira (2013).

Os resultados encontrados concordam Xavier et al. (2006) e Solano-Gallego et al. (2004) mostrando que o processo inflamatório com presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos (figura 2) decorrente da LVC se encontra em diferentes regiões da pele, seja ela íntegra ou lesionada. Também percebemos que em dois animais (animal 1 e animal 6) nos quais ocorreram consideráveis reduções nas lesões ulcerativas e alopecia o padrão histológico ao fim do tratamento não se alterou (figura 2 C e 2 E).

Ao analisar os escores atribuídos a inflamação e ao número de amastigotas detectados por campo em imersão não encontramos diferenças significativas, os escores podem ser vistos nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Escores atribuídos a inflamação encontrada nas amostras coradas com HE.

ANIMAL	D0	D30	D60	D90
1	3	3	3	2
2	2	2	2	2
3	3	3	3	3
4	2	3	2	2
5	2	3	3	3
6	2	2	2	3
SOMA	14	16	15	15

Tabela 3. Escores atribuídos ao numero de amastigotas por campo de maior aumento

<i>ANIMAL</i>	<i>D0</i>	<i>D30</i>	<i>D60</i>	<i>D90</i>
1	1	3	1	1
2	1	1	2	0
3	3	3	3	3
4	1	3	1	1
5	2	3	3	3
6	2	1	0	2
SOMA	10	14	10	10

4. CONCLUSÃO

Fica demonstrada alta sensibilidade do protocolo de IHQ utilizado, bem como a presença moderada ou intensa inflamação difusa e/ou perifolicular com padrão linfohistioplasmocitário a despeito da aparência integra da pele e da recuperação clínica do paciente .

Os resultados deste estudo mostram que o TAP-04 na dose de 1 mg/Kg, VO, 1x por semana por 90 dias foi bem tolerado pelos animais sem indícios de efeitos indesejáveis porém não foi capaz de reduzir o parasitismo na pele. Ressalta-se que este estudo utilizou animais naturalmente infectados com diferentes estágios clínicos da doença.

5. REFERÊNCIAS

Ferrer L, Juanola B, Ramos JA, Ramis A. Chronic colitis due to Leishmania infection in two dogs. **Vet Pathol.** 1991 Jul;28(4):342-3. doi: 10.1177/030098589102800414. PMID: 1949514.

Koutinas, A.F., Scott, D.W., Kontos, V., Lekkas, S., 1992. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. **Vet. Dermatol.** 3, 121–130

Madeira, M et al. (2009). Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target?. **Research in veterinary science.** 87. 260-2. 10.1016/j.rvsc.2009.03.008.

OLIVEIRA, V. V. G. **ASPECTOS RELACIONADOS À TRANSMISSÃO E À ATIVIDADE BIOLÓGICA DE TIAZÓIS SOBRE Leishmania (Leishmania) infantum (Nicolle, 1908).** [TESE]. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2017.

OLIVEIRA, V. V. G. **AVALIAÇÃO DAS LESÕES INFLAMATÓRIAS E DA CARGA PARASITÁRIA EM ÓRGÃOS DO SISTEMA GENITAL MASCULINO E FEMININO DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR Leishmania (Leishmania) infantum (Nicolle, 1908).** [DISSERTAÇÃO]. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2015.

Queiroz N. M. G. P. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. (Online) [Internet]. 2010**

Scott D.W., Miller D.H. & Griffin C.E. 2001. **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology.** 6th ed. Saunders, Philadelphia. 1528p

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of leishmania infantum-infected Dogs. **J. Comp. Pathol.**, v.130, p.7-12, 2004

TAFURI, W.L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues, **Journal of Immunological Methods**, Volume 292, Issues 1–2, 2004, Pages 17-23, ISSN 0022-1759.

TOLOSA. E.M.C. et al. **Manual de técnicas histológicas normal e patológica.** São Paulo: Manole, 2003. 331p.

Toplu N, Aydogan A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitol Res.** 2011 Oct;109(4):1051-7. doi: 10.1007/s00436-011-2345-0. Epub 2011 Apr 9. PMID: 21479577.

World Organization for Animal Health (OIE). 2018. Chapter. 3.1.11 – Leishmaniosis (most recent updates adopted in 2014). In **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, OIE, Paris.

Xavier, S.C., de Andrade, H.M., Monte, S.J.H. et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmaniainfection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res* 2, 17 (2006).

Apendice

Figura 1.

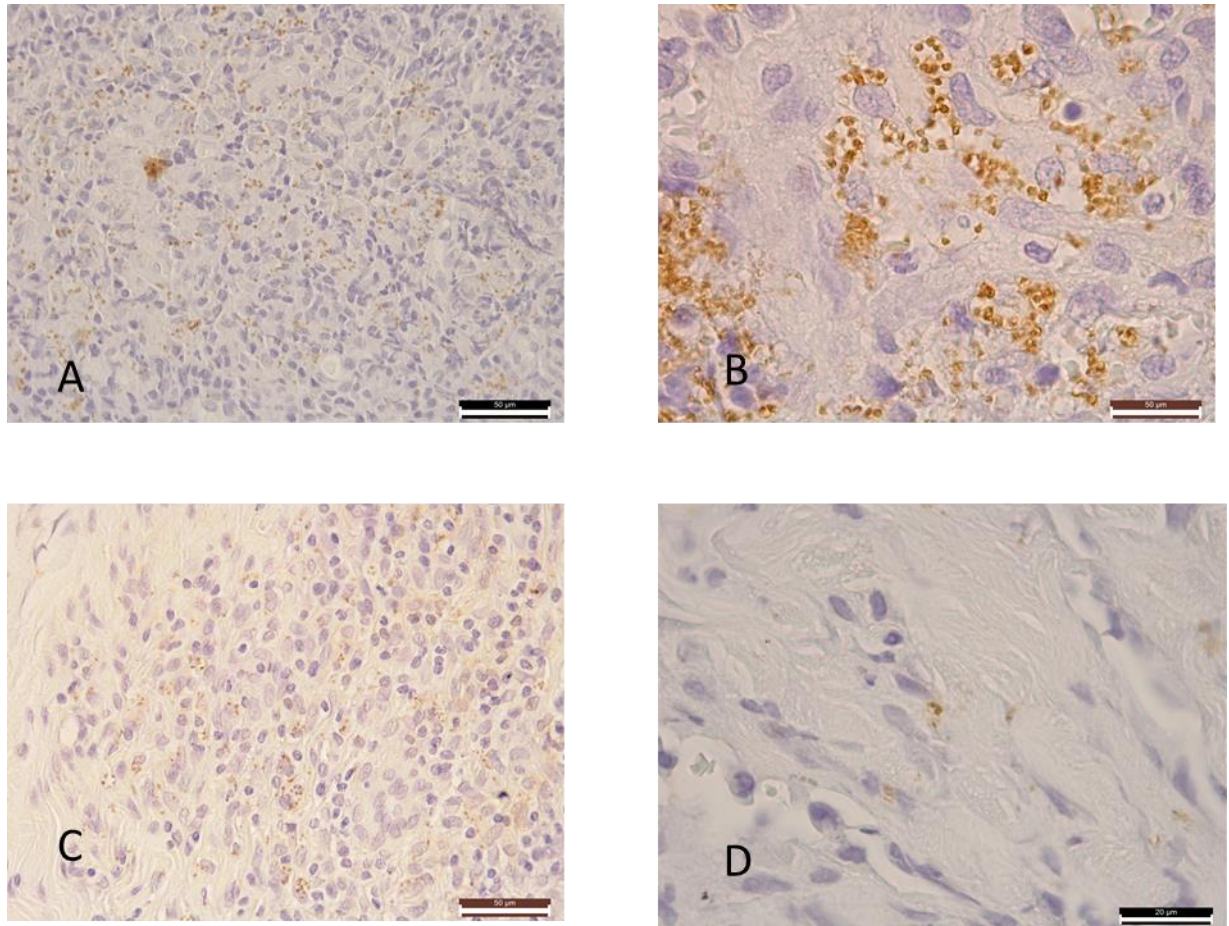


Fig 1. A. Formas amstigotas marcadas pela IHQ. D0 Animal 3.

Fig. 1 B. Formas amstigotas marcadas pela IHQ em maior aumento. D60 Animal 3, persistência do parasitismo em pele ao longo do tratamento.

Fig. 1 C. Diversas formas amastigotas em médio aumento (objetiva 40x), D90 Animal 5.

Fig. 1 D. Amastigotas no centro do campo, (Objetiva 100x), D90 animal 4.

Figura 2.

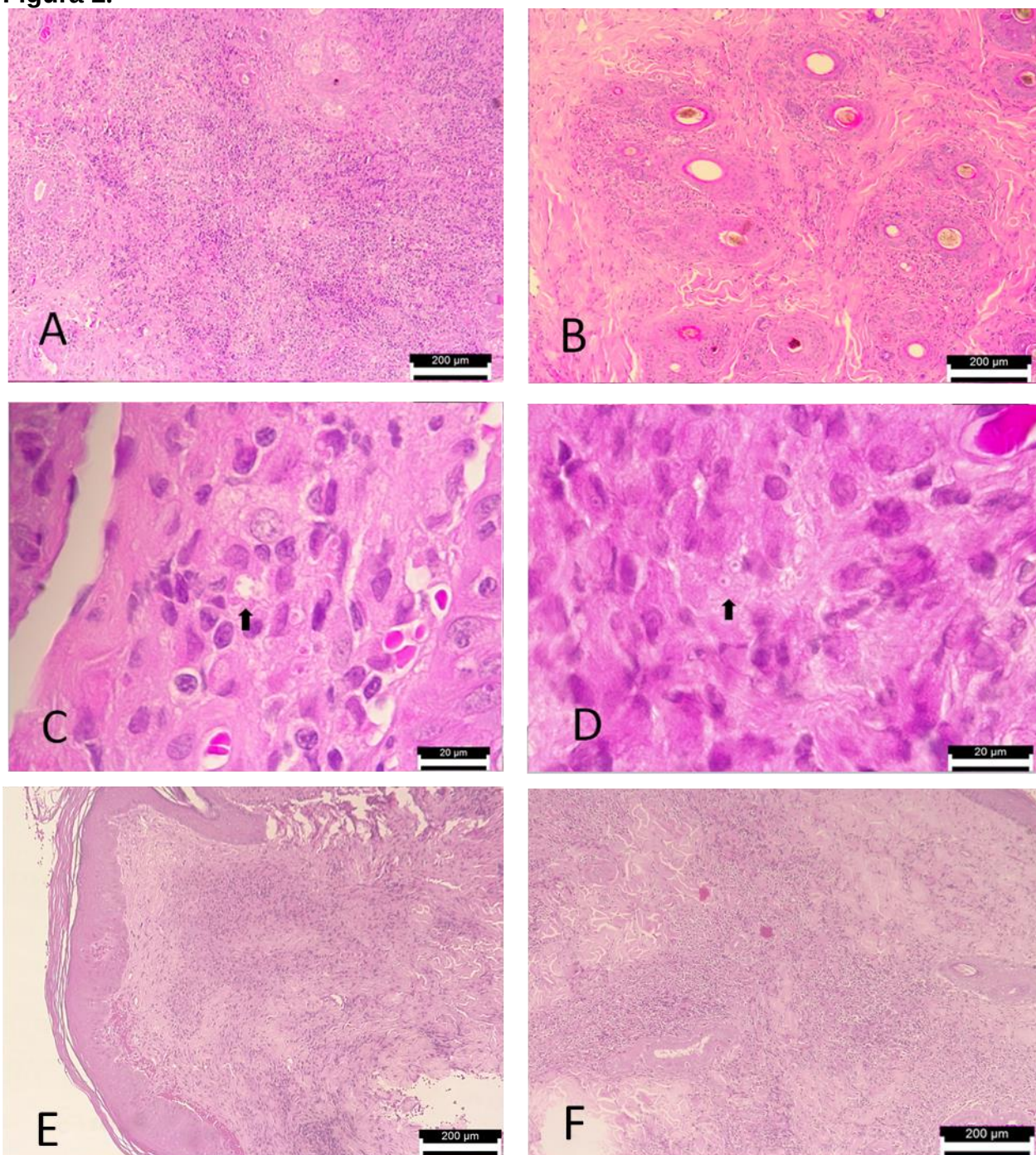


Fig. 2 A. Aspecto do infiltrado, intensa inflamação difusa D0, animal 1.

Fig. 2 B. Infiltrado perifolicular, D0, animal 2.

Fig. 2 C. Infiltrado linfohistioplasmocitário em maior aumento (Objetiva 100x), seta: vaculo com amstigotas, outras podem ser observadas no quadro. D0, animal 1.

Fig. 2 D. Infiltrado linfohistioplasmocitário em maior aumento (Objetiva 100x), seta: duas formas amastigotas, outras podem ser observadas no quadro. D0, animal 5.

Fig. 2 E. Aspecto da inflamação ao fim do tratamento de animal com melhora clínica do quadro dermatológico, animal 1, D90.

Fig. 2 F. Inflamação intensa ainda persistente ao fim do tratamento, D90, animal 6.