



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Amábili de Souza Rosar

**Estudo da eficácia do Milteforan® no tratamento da leishmaniose visceral canina na
região da grande Florianópolis, SC**

Florianópolis

2022

Amábili de Souza Rosar

Estudo da eficácia do Milteforan® no tratamento da leishmaniose visceral canina na região da grande Florianópolis, SC

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Hermes Stoco

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Flávia Quaresma

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rosar, Amábilli de Souza

Estudo da eficácia do Milteforan® no tratamento da leishmaniose visceral canina na região da grande Florianópolis, SC / Amábilli de Souza Rosar ; orientadora, Patrícia Hermes Stoco, coorientadora, Patrícia Flávia Quaresma, 2022.

115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Leishmaniose Visceral Canina. 3. Milteforan. 4. Leishmania infantum. 5. Tratamento. I. Stoco, Patrícia Hermes . II. Quaresma, Patrícia Flávia . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Amábilli de Souza Rosar

Estudo da eficácia do Milteforan® no tratamento da leishmaniose visceral canina no município de Florianópolis, SC

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Vitor Márcio Ribeiro
BRASILEISH / PUC MINAS

Prof. Dr. Álvaro Menin
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Patricia Hermes Stoco
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Patricia Hermes Stoco
Universidade Federal de Santa Catarina
Orientadora

Florianópolis, 2022

Dedico este trabalho aos meus pais, meu sobrinho, minha irmã, minha avó Amélia Rosa Rosar (*in memoriam*) e ao meu avô Valmor Rosar "Seu Moca" (*in memoriam*) e a todas as pessoas que se preocupam em promover o bem e a desenvolver uma sociedade melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse, me dando saúde e força para superar as dificuldades. À Santa Paulina e São Francisco de Assis, que sempre me protegem.

Gostaria de agradecer inicialmente as minhas professoras por todo carinho e paciência comigo durante meu mestrado e por serem exemplos de dedicação à pesquisa e ao ensino. A Professora Dra. Patricia Hermes Stoco pela dedicação ao meu projeto e pela oportunidade de ter sido sua aluna, que além de ser uma pessoa da qual eu admiro muito, é também uma orientadora extremamente responsável. A professora Dra. Patrícia Flávia Quaresma, da qual também admiro muito e agradeço por ter vindo para somar e por todos os ensinamentos passados, dedicação e ajuda. Ao professor Dr. Edmundo Carlos Grisard e professor Dr. Mário Steindel por também fazerem parte desse projeto e da minha formação. Sou muito grata de fazer parte desse grupo de pesquisa e de ter tido a oportunidade de desenvolver esta dissertação sob suas lideranças. O mérito deste trabalho é de todos eles também.

Agradeço aos professores do MIP/CCB/UFSC, principalmente ao Prof. Dr. Rafael da Rosa, à Profa. Dra. Gislaíne Fongaro e ao Prof. Dr. Glauber Wagner por sempre serem muito gentis e solícitos. Às minhas companheiras de laboratório Viviane, Bibiana, Laryssa, Carolina, Adriana, Ana Cláudia, Ana, Beatriz e Giovanna que além de todo o suporte, ajudaram a tornar os meus dias mais felizes.

Ao laboratório multiusuário LAMEB, LIAA, LVA e todo o seu corpo técnico, pelo auxílio na realização dos experimentos. Aos funcionários da limpeza (Leila, Rose) e segurança da UFSC (Cláudia) e aos demais, por toda a colaboração em manter a estrutura de nosso ambiente de trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Álvaro Menin (CCR/UFSC – Campus Curitiba) e a Dra. Carolina Reck (VERTÀ Laboratórios) pelas colaborações ao meu projeto.

Agradeço a toda equipe do Centro de Controle de Zoonoses (Cíntia, Ísis, Caroline, Paula, Rafael e Marcelo) por toda parceria durante meu projeto de mestrado.

Agradeço ao meu orientador da Graduação Prof. Dr. Alexandre Tavela por ter encaminhado os meus primeiros passos nessa área da Leishmaniose.

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas aos meus pais, minha irmã, meu afilhado, minha madrastra, minha melhor amiga Aline, minha amiga Victoria Zórtea, ao meu avô Valmor Rosar (*in memoriam*), à minha avó Amélia Rosar (*in memoriam*) e ao Gustavo

Rocha, que me deram apoio, me incentivaram nas horas difíceis e sempre me encorajaram a ir em busca dos meus sonhos, sem eles eu não chegaria até aqui.

Não poderia deixar de agradecer a todos os cães que fizeram parte deste projeto, seus tutores e Médicos Veterinários responsáveis, obrigada pela confiança.

Por fim, à Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências e às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPESC pelo suporte financeiro e técnico para o êxito de meu trabalho.



"Nunca jamais desanimeis,
embora venham ventos contrários."
(Santa Paulina)

“Quem não pode fazer grandes coisas,
faça ao menos o que tiver na medida de suas forças,
certamente não ficará sem recompensa.”
(Santo Antônio)

RESUMO

As leishmanioses são consideradas doenças infecciosas antropozoonóticas, causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. A forma mais grave da doença é a leishmaniose visceral (LV), causada pela *Leishmania infantum*, sendo uma doença potencialmente fatal e que afeta o sistema fagocítico mononuclear. O cão doméstico é o principal reservatório de *L. infantum* no ambiente urbano de transmissão. Até 2007, a região Sul do Brasil não era considerada endêmica para LV, entretanto surtos de leishmaniose visceral canina (LVC) ocorreram a partir de 2008, sendo seguidos da ocorrência de casos de LV em humanos. Além de ser uma área endêmica recente, um cenário epidemiológico diferenciado é observado em Florianópolis, SC, no qual, a presença do vetor clássico da LV, *Lutzomyia longipalpis*, não foi registrada até o momento. O uso do medicamento Milteforan® para o tratamento da LVC vem ocorrendo no Brasil desde 2016, mas poucos estudos investigaram a sua real eficácia em populações de cães naturalmente infectados. Portanto, o monitoramento clínico e da carga parasitária de cães tratados é de suma importância para avaliar a eficácia do medicamento e o prognóstico da infecção em cães submetidos ao tratamento. Sendo assim, este projeto teve como objetivo avaliar aspectos clínicos, parasitológicos e histopatológicos de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, no município de Florianópolis, antes e após o tratamento com Milteforan®. No presente estudo, foram coletadas amostras de pele e linfonodo de 24 cães antes (T0) e depois do tratamento (T1- 31 dias após o início e T2 – 6 meses após o fim do tratamento). Os cães apresentaram uma redução significativa no número de parasitos/mg de tecido (pele) após o tratamento com Milteforan®. Os resultados mostraram também uma diminuição nos valores de estadiamento clínico dos cães após tratamento. Este estudo demonstrou que valores de estadiamento clínico, quantidade de macrófagos contendo amastigotas de *Leishmania* spp. e do infiltrado inflamatório em derme e epiderme dos cães com LV variaram em função da carga parasitária. Além disso, os resultados demonstram que a carga parasitária na pele de cães que receberam esquema terapêutico 1 (Miltteforan®+alopurinol+domperidona) foi menor do que a encontrada em animais que realizaram esquema terapêutico 2 (Miltteforan® ou Miltteforan®+alopurinol ou Miltteforan®+imunoterapia) considerando o tempo de seis meses após o tratamento. Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o tratamento com Miltteforan® leva a uma diminuição da carga parasitária após o tratamento, assim como a melhora dos sinais clínicos, demonstrando a eficácia do tratamento a despeito de não haver cura parasitológica.

Palavras-chaves: Leishmaniose Visceral Canina; *Leishmania infantum*; tratamento; milteforan; saúde pública.

ABSTRACT

Leishmaniasis are considered anthroponotic infectious diseases caused by protozoa parasites of the genus *Leishmania*. The most severe form of the disease is the visceral leishmaniasis (VL), caused by *Leishmania infantum*, being a potentially fatal disease that affects the mononuclear phagocytic system. The domestic dog is the main reservoir of *L. infantum* in the urban transmission environment. Until 2007, the southern region of Brazil was not considered endemic for VL, however outbreaks of canine visceral leishmaniasis (CVL) occurred from 2008 onwards, being followed by the occurrence of VL cases in humans. In addition to being a recent endemic area, a different epidemiological scenario is observed in Florianópolis, SC, in which the presence of the classic VL vector, *Lutzomyia longipalpis*, has not been recorded so far. The use of the drug Milteforan®, for the treatment of CVL, has been happening in Brazil since 2016, but few studies have investigated its real effectiveness in populations of naturally infected dogs. In this way, the clinical and parasite load monitoring of treated dogs is important to assess the efficacy of the drug and the prognosis of infection in dogs undergoing treatment. Therefore, this project aimed to evaluate clinical, parasitological and histopathological aspects of dogs naturally infected with *L. infantum*, in the city of Florianópolis, before and after the treatment with Milteforan®. In the present study, skin and lymph node samples were collected from 24 dogs before (T0) and after treatment (T1- 31 days after initiation and T2 - 6 months after the end of treatment). Dogs showed a significant reduction in the number of parasites/mg tissue (skin) after treatment with Milteforan®. The results also showed a decrease in the clinical staging values of dogs after treatment. This study demonstrated that clinical staging values, amount of macrophages containing *Leishmania* spp. and the inflammatory infiltrate in the dermis and epidermis of dogs with VL varied according to the parasite load. In addition, the results demonstrate that the parasite load on the skin of dogs that received therapeutic regimen 1 (Milteforan®+allopurinol+domperidona) was lower than that found in animals that underwent therapeutic regimen 2 (Milteforan® or Milteforan®+allopurinol or Milteforan®+imunoterapia), considering the time of six months after treatment. Taken together, the results obtained in this work demonstrate that treatment with Milteforan® leads to a decrease in the parasite load after treatment, as well as an improvement in clinical signs, demonstrating the effectiveness of the treatment despite the lack of parasitological cure.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis; *Leishmania infantum*; treatment; milteforan; public health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho esquemático das principais formas biológicas dos protozoários causadores de leishmanioses.	25
Figura 2 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	29
Figura 3- Manifestações clínicas e características imunológicas da infecção por <i>Leishmania infantum</i> em cães	30
Figura 4 - Representação esquemática do local de realização das biópsias de pele dos cães participantes do estudo.	48
Figura 5 - Distribuição geográfica dos cães com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral incluídos como participantes deste trabalho nos municípios de Florianópolis e São José, Santa Catarina.	55
Figura 6 - Sinais clínicos da LVC mais frequentes encontrados nos cães com leishmaniose visceral avaliados no presente estudo antes do início do tratamento com Milteforan®.	56
Figura 7 - Sinais clínicos de LVC encontrados em dois cães avaliados antes e após tratamento com Milteforan®.	58
Figura 8 - Peso dos cães com diagnóstico de leishmaniose visceral avaliados antes (T0) e após o tratamento com Milteforan® (T1- 31 dias após início do tratamento e T2 – 6 meses após o fim do tratamento).	59
Figura 9 - Distribuição de cães com diagnóstico de leishmaniose visceral avaliados antes (T0) e após o tratamento com Milteforan® (T1- 31 dias após início do tratamento e T2 – 6 meses após o fim do tratamento) de acordo com os níveis de estadiamento clínico.	60
Figura 10 - Comparação do estadiamento clínico de cães com LVC antes e após a administração de Milteforan® (T0 = antes do tratamento; T1 = 31 dias após a primeira dose do tratamento) ($p < 0,05^*$, Teste de Wilcoxon $W=0$).	61
Figura 11 - Comparação do estadiamento clínico de cães com LVC antes e após a administração de Milteforan® (T0 = antes do tratamento; T1 = 31 dias após a primeira dose do tratamento; T2 = 6 meses após o fim do tratamento) ($p < 0,05$ teste de Friedman $F=9,57$; teste de comparações múltiplas post-hoc de Dunn = $p < 0,05^*$).	61
Figura 12 - Resultado representativo do perfil da digestão com <i>HaeIII</i> do marcador <i>ITS1</i> amplificado a partir de DNA obtido de amostras de pele dos cães infectados diagnosticados com leishmaniose visceral.	62
Figura 13 - Comparação da carga parasitária média na pele de cães com leishmaniose visceral ($n=11$), obtida por qPCR, antes e após o tratamento com Milteforan®.	65

Figura 14 - Comparação das cargas parasitárias médias da pele de cães com leishmaniose visceral (n=24) obtida por qPCR antes (T0) e após 31 dias após a primeira dose do tratamento (T1) com Milteforan® através do Teste de Wilcoxon $W=0$, * $p<0,05$	66
Figura 15 - Comparação entre os esquemas terapêuticos empregados no tratamento e a carga parasitária dos cães com leishmaniose visceral.	67
Figura 16 - Perfil do infiltrado inflamatório na pele do cão número 3, antes e após tratamento com Milteforan®.	68
Figura 17 - Análise histomorfológica de tecido cutâneo revelando dermatite superficial e profunda linfoplasmohistiocítica difusa moderada em cão com leishmaniose visceral (cão número 4) 31 dias após o início do tratamento com Milteforan®.....	69
Figura 18 - Presença de macrófagos contendo formas amastigotas de <i>L. infantum</i> na pele do cão com leishmaniose visceral de número 3 antes do tratamento.....	70
Figura 19 - Correlação da carga parasitária de cães com leishmaniose visceral antes do tratamento com Milteforan® através de regressão linear com as variáveis de peso, estadiamento clínico, média leucocitária e presença de macrófagos contendo amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	71
Figura 20 - Sinais clínicos de um cão com leishmaniose visceral destinado à eutanásia no CCZ de Florianópolis.	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Classificação geral dos animais quanto à exposição a <i>L. infantum</i> , infecção e doença.	34
Quadro 2 - Estadiamento clínico, manejo e tratamento da leishmaniose visceral canina baseado na sorologia, sinais clínicos e achados laboratoriais.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo terapêutico recebido por cada cão positivo para LVC participante do presente estudo.	45
Tabela 2 - Porcentagem de cães com diagnóstico de leishmaniose visceral acometidos com os diferentes sinais clínicos comumente relatados para a doença.	57
Tabela 3 - Estadiamento clínico dos cães com diagnóstico de leishmaniose visceral em Florianópolis antes do tratamento com Milteforan® (T0), 31 dias após a primeira dose do tratamento (T1) e 6 meses após o fim do tratamento (T2).	59
Tabela 4 - Carga parasitária na pele dos cães com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral antes e após o tratamento com Milteforan® avaliada por qPCR.	63
Tabela 5 - Dados gerais dos cães com diagnóstico de leishmaniose visceral que foram eutanasiados pelo CCZ de Florianópolis e tiveram a necropsia realizada pelo Laboratório de Protozoologia da UFSC. Os tecidos coletados foram utilizados para a tentativa do isolamento em cultura do parasito.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AmB – Desoxicolato de anfotericina B
- BID – Duas vezes ao dia
- CCZ – Centro de Controle de Zoonoses
- CD4 – *Cluster of differentiation 4*
- CD8 – *Cluster of differentiation 8*
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
- CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária
- Ct – *Cycle threshold*
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatados
- DPP – *Dual Path Platform*
- DRC – Doença renal crônica
- ELISA – Ensaio imunoenzimático
- G – Gauge
- GPI – Glicosil fosfatidil inositol
- H&E – Hematoxilina e eosina
- IFN γ – Interferon gama
- IgG – Imunoglobulina G
- IL-4 – Interleucina 4
- IL-5 – Interleucina 5
- IL-9 – Interleucina 9
- IL-13 – Interleucina 13
- IRIS – *International Renal Interest Society*
- kDNA – DNA do cinetoplasto
- LACENs – Laboratórios centrais estaduais
- LAMEB – Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
- La* – *Leishmania amazonensis*
- Lb* – *Leishmania braziliensis*
- LC – Leishmaniose cutânea
- LM – Leishmaniose mucocutânea
- LV – Leishmaniose visceral
- LVC – Leishmaniose visceral canina

LVH – Leishmaniose visceral humana
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIL – Miltefosina
MO – Microscopia óptica
MS – Ministério da Saúde
MT – *Miltefosine transporter*
n – Número amostral
ND – Não detectado
NNN – Novy-MacNeal-Nicolle
NS – Não significativo
OD – Densidade óptica
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PM – Peso Molecular
PNVCLV – Programa Nacional de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
PSS – Pressão sistêmica sanguínea
qPCR – PCR quantitativa em tempo real
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RIFI – Reação de imunofluorescência indireta
rK9 – *Kinesin-related antigen 9*
rK26 – *Kinesin-related antigen 26*
rK39 – *Kinesin-related antigen 39*
RNA – Ácido ribonucleico
RPC – Razão proteína-creatinina urinárias
SBF – Soro Bovino Fetal
Sbv – Antimoniais pentavalentes
SFAs – Superintendências Federais de Agricultura
SFM- Sistema fagocítico mononuclear
SID – Uma vez ao dia
SVEs – Serviços Veterinários Oficiais dos Estados
T0 – antes do tratamento com o medicamento Milteforan®
T1 – 31 dias após o início do tratamento com Milteforan®
T2 – 6 meses após o fim do tratamento com Milteforan®

Th1 – Resposta T citotóxica do tipo 1

Th2 – Resposta T auxiliares do tipo 2

TNF α – Fator de necrose tumoral – alfa

TR – Teste rápido

UVLs – Unidades Veterinárias Locais

WHO – *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

> – Maior

< – Menor

+ – Positivo

°C – Graus Celsius

kg – Quilograma

Log- Logaritmo

Ln – Logaritmos naturais

Log- Logaritmo

mg – Miligrama

ml – Mililitro

mm – Milímetro

Pb – Pares de base

pH – Potencial hidrogeniônico

pmol – Picomol

® – Marca registrada

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μM – Micromolar

μm – Micrômetro

U – Unidade de atividade enzimática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 ZOONOSES E SAÚDE ÚNICA.....	22
1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES	22
1.3. LEISHMANIOSE VISCERAL	23
1. 3.1 Histórico	23
1.3.2 Agente etiológico.....	24
1.3.3 Vetores e transmissão	25
1.3.4 Hospedeiros de importância epidemiológica na LV	26
1.3.5 Ciclo biológico de <i>Leishmania infantum</i>	27
1.3.6 Manifestações clínicas da LV em cães	29
1.3.7 Aspectos histopatológicos da LVC	31
1.3.8 Diagnóstico da LVC	32
1.3.9 Notificação de casos positivos ou suspeitos de LVC	34
1.3.10 Tratamento.....	35
1.3.11 Prevenção e controle.....	39
3.12 Eutanásia de cães soropositivos.....	41
1.3.13 Importância do estudo	41
2. OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL.....	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. METODOLOGIA.....	44
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	44
3.2 ANIMAIS SELECIONADOS PARA O ESTUDO	44
3.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA	46
3.4 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	47
3.4.1 Cães em tratamento	47

3.4.1.1 Biópsias de pele	47
3.4.1.2 Punção de linfonodo poplíteo	48
3.4.2 Cães eutanasiados	49
3.5 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	49
3.5.1 Pesquisa direta do parasito através de microscopia óptica (MO).....	49
3.5.2 Isolamento de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp	49
3.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	50
3.6.1 Extração de DNA a partir de amostras biológicas.....	50
3.6.2 Quantificação de DNA por espectrofotometria	50
3.6.3 Identificação da espécie de <i>Leishmania</i> presente nos cães portadores de LVC.....	50
3.6.4 Quantificação da carga parasitária por qPCR.....	51
3.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	52
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
4. RESULTADOS	54
4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS CÃES.....	54
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DOS ISOLADOS DE <i>Leishmania</i> sp. DOS CÃES UTILIZADOS NO PRESENTE ESTUDO.....	61
4.3 AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Leishmania infantum</i> NOS DIFERENTES TEMPOS PRÉ E PÓS TRATAMENTO COM MILTEFORAN®.	62
4.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	67
4.5 VALIDAÇÃO DA AMOSTRA DE LINFONODO PARA DETECÇÃO E ISOLAMENTO DO PARASITO.....	72
5. DISCUSSÃO	77
6. RESUMO DOS RESULTADOS	86
7. CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICE 1- DADOS GERAIS DOS CÃES PARTICIPANTES DO PROJETO	107

APÊNDICE 2- TABELA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS CÃES PARTICIPANTES DO PROJETO.	108
APÊNDICE 3 - EXAMES LABORATORIAIS E ESTADIAMENTO CLÍNICO DOS CÃES PARTICIPANTES DO PROJETO ANTES DO TRATAMENTO (T0)	109
APÊNDICE 4- LOTE DO MILTEFORAN® UTILIZADO PELOS CÃES POSITIVOS PARA LVC PARTICIPANTES DO PRESENTE ESTUDO.	110
ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	111

1. INTRODUÇÃO

1.1 ZOONOSES E SAÚDE ÚNICA

As zoonoses são doenças infecciosas que acometem seres humanos e animais domesticados ou de vida silvestre. São doenças que podem ser causadas por bactérias, fungos, vírus, helmintos ou protozoários e podem ser transmitidas por meio de contato direto entre o ser humano e o animal, contato com ambientes contaminados, do consumo de água ou alimentos contaminados e a partir de animais vetores desses agentes patogênicos (LOBO et al., 2021). As doenças zoonóticas correspondem a mais da metade das doenças infecciosas humanas e a aproximadamente três em cada quatro novas doenças infecciosas emergentes, representando um importante contexto da saúde única. Atualmente mais de 200 diferentes tipos de zoonoses são conhecidos e monitorados por órgãos de saúde global, acarretando impactos humanos, econômicos e no bem-estar animal (WHO, 2019).

O conceito de saúde única estabelece uma relação de equilíbrio na qual, a qualidade da saúde humana está intimamente relacionada com a qualidade da saúde animal e a qualidade ambiental do meio em que está inserida. Dessa forma, o controle de zoonoses é tratado de forma multissetorial por órgãos de saúde pública, que promovem o monitoramento, diagnóstico e tratamento de doenças zoonóticas (LOBO et al., 2021).

Além do aspecto voltado para a transmissão de agentes comuns e a inter-relação com o meio ambiente, os animais de companhia, notadamente o cão, envolve outro importante papel na Visão Saúde Única: segundo a American Heart Society, a adoção de animais de companhia, em particular de cães, pode constituir uma recomendação razoável para a diminuição do risco de doença cardiovascular (RIBEIRO; PINTO, 2020).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses estão incluídas dentre as zoonoses mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente indivíduos com baixo poder socioeconômico nos países em desenvolvimento (ALVAR et al., 2012). Devido à sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, as leishmanioses tornaram-se um grande problema no que diz respeito à saúde pública (MACHADO, 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses são divididas em três principais formas clínicas, a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose mucocutânea (LMC) (WHO, 2022). A forma clínica da doença depende da espécie de *Leishmania* e também da resposta imune desenvolvida pelo indivíduo parasitado

(KAYE; SCOTT, 2011). No ano de 2020, a LC foi classificada como endêmica em 90 países, enquanto a LV, considerada o quadro mais grave da doença, distribuiu-se de maneira endêmica em 79 países (WHO, 2021). Nas Américas, são reportados casos de LV endêmica em 11 países, sendo o Brasil responsável por 97% de todos os casos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020).

O primeiro registro de LV humana no Brasil foi relatado em 1913, em um paciente oriundo da cidade de Boa Esperança/MT (ALENCAR; DIETZE, 1991). No Brasil, historicamente, a LV se distribui principalmente em áreas rurais, correspondendo a cerca de 95% dos casos do país (DEANE; DEANE, 1954). No entanto, a partir da década de 80, a doença tornou-se prevalente em centros urbanos. Fatores como a migração de pessoas das áreas rurais endêmicas para os centros urbanos, a adaptação do vetor ao ambiente doméstico, a presença de reservatórios de doenças como cães domésticos, a desnutrição e a falta de saneamento básico são considerados fatores contribuintes para a urbanização e expansão geográfica de LV (SILVA et al., 2017; HARHAY et al., 2011; WERNECK et al., 2008). Dentre os anos de 2017 a 2019, a LV ocorreu em 1.573 municípios do Brasil, com uma maior incidência nos estados da região Norte e Nordeste (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020).

1.3. LEISHMANIOSE VISCERAL

1.3.1 Histórico

No ano de 1908, o bacteriologista francês, Charles Jules Henry Nicolle, descreveu pela primeira vez a presença de cães infectados por *Leishmania infantum*, no norte da África (NICOLLE; COMTE, 1908). A partir dessa descoberta, os cães começaram a ser descritos como importantes hospedeiros reservatórios de *Leishmania* spp. (CHAGAS, 2019).

No Brasil, dentre os anos de 1936 a 1940, em investigação liderada pelo pesquisador Evandro Chagas com intuito de estudar a epidemiologia da LV, foram reportados oito casos de LV em humanos, além de sete cães e um gato infectados por *L. infantum*, em municípios da região de Belém/PA (CHAGAS et al., 1937). A partir da década de 50, estudos realizados no Ceará (DEANE; DEANE, 1954) e no Pará (LAINSON; SHAW; LINS, 1969) descreveram espécies de canídeos como sendo importantes reservatórios de *L. infantum*. A primeira epidemia de LV aconteceu no ano de 1981 em Teresina, capital do estado do Piauí, localizado no nordeste do Brasil (SILVA et al., 2017). No ano de 1994, o primeiro caso autóctone de leishmaniose

visceral canina (LVC) foi diagnosticado na cidade de Belo Horizonte/MG, confirmando a migração da doença para grandes centros urbanos (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

O estado de Santa Catarina era considerado indene para LV até a notificação e a confirmação dos primeiros cinco casos autóctones de LVC no ano de 2010, na região da Lagoa da Conceição, no município de Florianópolis (STEINDEL et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2012). Desde então, segundo os relatórios do Centro de Controle de Zoonoses de Florianópolis, foram notificados 776 casos positivos de LVC (2010-2021) no município (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, 2021). A transmissão autóctone da LVC, em uma área com grande fluxo turístico como Florianópolis, representa um risco para a saúde coletiva e também o estabelecimento de uma importante antropozoonose na região Sul do Brasil (STEINDEL et al., 2013). No ano de 2017 foram registrados três casos autóctones de leishmaniose visceral humana (LVH) em Florianópolis, nos bairros do Pantanal, Saco dos Limões e Rio Tavares (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2017). Em 2020, um novo caso humano foi notificado procedente do bairro Agrônômica (DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2022).

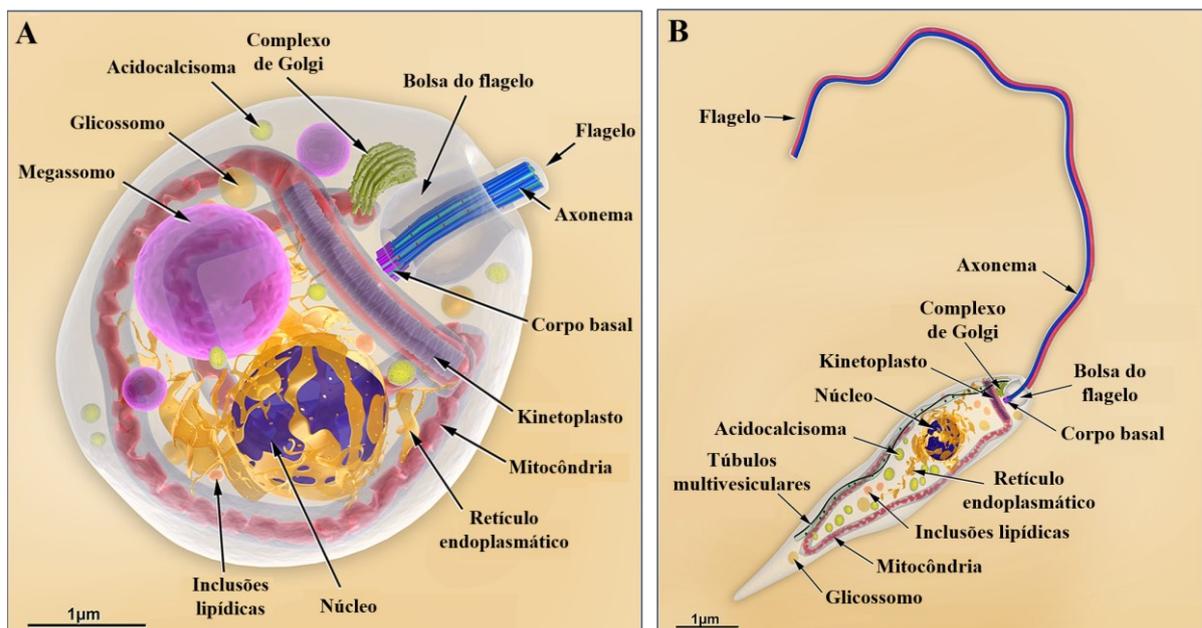
1.3.2 Agente etiológico

As leishmanioses são causadas por parasitos unicelulares do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Os agentes etiológicos da LV pertencem ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*. A espécie *L. donovani* é responsável pela doença em regiões da Ásia e África, enquanto que *L. infantum* é a principal espécie causadora da doença nas regiões do mediterrâneo, leste e centro da Europa, Ásia central e nas Américas. (GONTIJO; MELO, 2004). No Brasil, o agente etiológico da LVC é a espécie *L. infantum* (COIRO; SILVA; LANGONI, 2013), no entanto, a espécie *L. amazonensis*, conhecida por causar leishmaniose cutânea e cutâneo-disseminada, já tenha sido isolada de humanos (SOUZA et al., 2018) e cães com forma clínica visceral (ALEIXO et al., 2006).

A *L. infantum* apresenta duas formas biológicas principais definidas de acordo com o hospedeiro e etapa do ciclo em que se encontram (NEVES, 2016; PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012; HANDMAN, 2001). A forma amastigota (Figura 1A) é observada como célula imóvel e ovoide presente no interior de fagócitos mononucleados dos hospedeiros, sendo essa a forma responsável pela patogenia da doença (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK,

1987). A forma promastigota (Figura 1B) é forma flagelada e alongada, sendo encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados (flebotomíneos). A forma promastigota metacíclica é a forma infectante para os hospedeiros vertebrados encontrados livres nas porções anteriores do trato digestivo do inseto vetor. Diferenciam-se morfologicamente por possuírem o diâmetro do corpo reduzido e um flagelo mais longo, sendo cerca de duas vezes maior que o comprimento do corpo celular (NEVES, 2016; HANDMAN 2001; KAYE; SCOTT, 2011).

Figura 1- Desenho esquemático das principais formas biológicas dos protozoários causadores de leishmanioses.



Forma amastigota, encontrada parasitando as células de vertebrados (A); forma promastigota, encontrada no interior do vetor invertebrado (flebotomíneo) (B).

Fonte: adaptado de Teixeira et al., (2013).

1.3.3 Vetores e transmissão

A *Leishmania* spp. é transmitida naturalmente para os hospedeiros vertebrados, a partir da hematofagia de fêmeas de insetos flebotomíneos, conhecidos popularmente como birigui ou mosquito-palha, devido a sua coloração característica em tons de cor palha (GALATI, 2003). Pertencentes à ordem Diptera, à família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae, aproximadamente 900 espécies de flebotomíneos já foram descritas, sendo encontradas mais de 500 espécies nas Américas e 375 espécies distribuídas pelo velho mundo (AKHOUNDI et al., 2016). Dentre as espécies de flebotomíneos, foi comprovada a transmissão de *Leishmania* spp. por pelo menos 30 espécies e ainda existem ao menos 40 espécies suspeitas de atuarem como vetores (ANVERSA et al, 2018).

Os flebotomíneos são insetos que, durante seus estágios larvais, desenvolvem-se em ambientes repletos de matéria orgânica, principalmente de origem vegetal, enquanto que no estágio adulto, indivíduos de ambos os sexos se alimentam de seivas de plantas. Apenas as fêmeas adultas são hematófagas, sendo o sangue importante para a maturação dos ovos de flebotomíneos (COSTA, 2011).

Flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Pintomyia*, *Evandromyia*, *Psychodopygus* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo são os vetores das diferentes espécies de *Leishmania*, sendo a espécie *Lutzomyia longipalpis* o vetor classicamente descrito como responsável pela transmissão de *L. infantum* no novo mundo (COSTA, 2011; SHIMABUKURO; GALATI, 2011). No entanto, em algumas regiões de incidência da LV, como no caso de Florianópolis em Santa Catarina, o inseto vetor *L. longipalpis* ainda não foi encontrado, sendo a transmissão da LV atribuída a outras espécies como *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei*. No entanto, estudos ainda se fazem necessários para a confirmação desses insetos como vetores de *L. infantum* (SILVA, 2019; CATECATI, 2018; DIAS et al., 2013).

O Ministério da Saúde (2014) descreveu que alguns autores admitem a hipótese da transmissão entre a população canina através da ingestão de carrapatos infectados, presença de pulgas, através de mordeduras ou ferimento, ingestão de vísceras contaminadas, transmissão venérea, transmissão transplacentária, transfusão sanguínea, porém não existem evidências científicas sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão para humanos ou na manutenção da enzootia.

1.3.4 Hospedeiros de importância epidemiológica na LV

No contexto da LV, em virtude do grande número de hospedeiros mamíferos que incluem marsupiais, roedores, primatas e carnívoros, além de outros animais sinantrópicos, torna-se difícil estabelecer o papel epidemiológico de cada um deles (DANTAS-TORRES et al., 2012). Por outro lado, o cão (*Canis familiaris*) tem importante relevância no ciclo de transmissão, sendo o principal reservatório do parasito no ambiente doméstico, seja rural ou urbano. Por apresentarem células infectadas no tecido subcutâneo, além dos órgãos linfoides, os cães possuem um papel fundamental como reservatórios de *L. infantum*. Este parasitismo cutâneo está comumente presente tanto em cães assintomáticos quanto naqueles sintomáticos, sendo este fato muito relevante para a dinâmica e epidemiologia de transmissão da *L. infantum* (NOGUEIRA et al., 2019; REIS et al., 2006), visto que a pele do animal é o local em que ocorre

o primeiro contato entre o parasito e o hospedeiro (SILVA et al., 2001). Portanto, os cães têm sido alvo de medidas de controle para o bloqueio da transmissão de *L. infantum* para os humanos.

Alguns fatores predisponentes nos cães foram descritos, incluindo raça, idade e antecedentes genéticos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Algumas raças de cães, como Boxer, *Cocker Spaniel*, *Rottweiler* e Pastor Alemão, parecem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença (FRANÇA-SILVA et al., 2003). Além disso, o gene *Slc11c1* (*Solute carrier family 11 member a1*), anteriormente denominado *N-RAMPI*, e certos alelos dos genes *MHC II* foram associados à suscetibilidade a LV (SANCHEZ-ROBERT et al., 2008). A idade também parece ser um fator importante, com maior prevalência relatada em cães menores de 3 anos e maiores de 8 anos (CARDOSO et al., 2004).

1.3.5 Ciclo biológico de *Leishmania infantum*

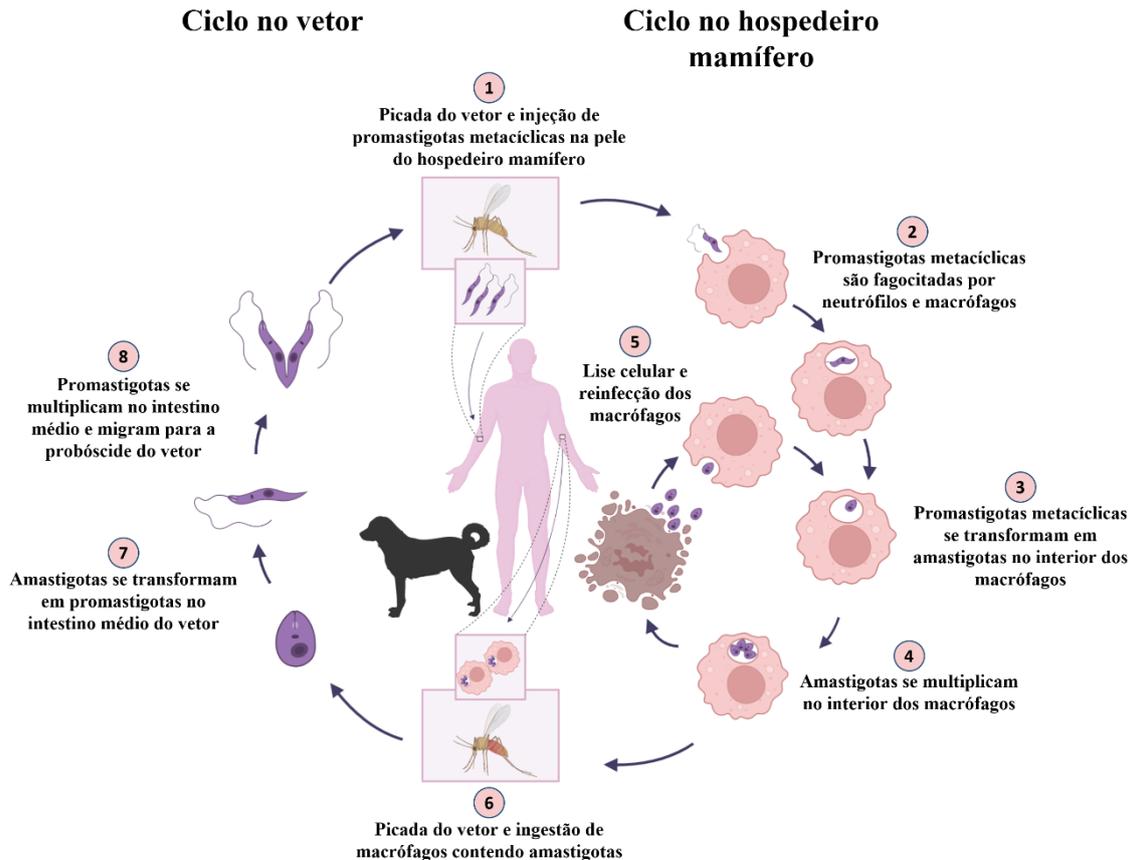
O ciclo biológico de *L. infantum* (Figura 2) ocorre na maioria das vezes entre dois hospedeiros, um flebotomíneo e um mamífero, que apresentam estágios celulares distintos do parasito (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). As fêmeas de flebotomíneos se alimentam do sangue de mamíferos para o processo de maturação de seus ovos, como parte do seu ciclo reprodutivo (KAYE; SCOTT, 2011). Durante o processo de hematofagia, essas fêmeas de flebotomíneos regurgitam, por meio de sua probóscide, componentes salivares contendo substâncias anticoagulantes e vasodilatadoras, que auxiliam na alimentação por telmatofagia. No entanto, quando infectadas com protozoários do gênero *Leishmania*, formas promastigotas metacíclicas também são depositadas sobre a pele do hospedeiro mamífero durante o processo de hematofagia (KAYE; SCOTT, 2011). Do ponto de vista do hospedeiro, a telmatofagia produz maior irritação no local da picada devido à maior agressão dos tecidos que favorece a liberação de mediadores desencadeadores dos fenômenos hemostáticos.

No local da picada no hospedeiro mamífero, as formas promastigotas são inicialmente encontradas no interior de neutrófilos, sendo desencadeado um processo de apoptose destas células. Dessa forma, sinais anti-inflamatórios promovidos por outras células de defesa induzem a fagocitose por macrófagos de corpos apoptóticos provenientes dos neutrófilos parasitados contendo formas amastigotas (PETERS et al., 2008). Dentro de neutrófilos em um primeiro momento, bem como em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), as formas promastigotas flageladas se transformam em formas amastigotas. Entretanto, apenas nas células

do SFM é que estas amastigotas se multiplicam até promoverem a ruptura dessas células de defesa, liberando as formas amastigotas que serão novamente fagocitadas e repetirão o ciclo de multiplicação.

Células infectadas e amastigotas livres podem ser ingeridos durante a hematofagia das fêmeas de flebotomíneos (KAYE; SCOTT, 2011). As formas amastigotas iniciam o processo de diferenciação, ainda no intestino médio do inseto vetor, em formas promastigotas procíclicas flageladas, na qual, por meio da mobilidade promovida pela presença do flagelo, migram para a válvula estomodeal do inseto vetor e se diferenciam na forma promastigota metacíclica infectiva ao hospedeiro mamífero. Foi demonstrado recentemente por Serafim e colaboradores (2018) que alimentações sanguíneas sequenciais realizadas pelos insetos vetores, mesmo que em hospedeiros não infectados, promovem a replicação de *Leishmania*, revertendo a metaciclogênese e aumentando a infectividade do vetor (SERAFIM et al., 2018). O processo completo no intestino do parasito demora cerca de 4 a 25 dias (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

O período de incubação é bastante variável tanto para o humano como para o cão, sendo que no humano pode variar de 10 dias a 24 meses, com média entre dois e seis meses (NEVES, 2016). Já no cão pode levar de três meses a vários anos, com média entre três e sete meses. Nos felinos é ainda mais variável podendo levar vários anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Embora os cães sejam os principais hospedeiros reservatórios do parasito nos centros urbanos foi observado por xenodiagnóstico que gatos infectados por *L. infantum* são capazes de infectar *Lutzomyia longipalpis* (MENDONÇA et al., 2017a; SILVA et al., 2010), sendo, portanto, potenciais reservatórios dessa zoonose. Os estudos sobre a LV felina são limitados e a doença em gatos ainda é considerada negligenciada (PENNISI et al., 2015).

Figura 2 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2017).

1.3.6 Manifestações clínicas da LV em cães

A manifestação clínica da LV em cães é muito variável (RIBEIRO et al., 2013a). Um cão infectado pode desenvolver infecção sintomática, e evoluir clinicamente até à morte, enquanto outro pode continuar assintomático por toda vida. Os animais assintomáticos têm um papel importante na transmissão do agente e se apresentam como a principal casuística da infecção. Por não apresentarem sinais clínicos, não são tomadas medidas de controle, e os mesmos continuam disseminando o agente entre a população (SANTOS, 2011).

Os cães infectados que podem estar clinicamente sadios (Figura 3), em geral apresentam resposta imune predominante do tipo Th1, que inclui menores níveis de anticorpos, maior imunidade celular, menor carga parasitária e conseqüentemente menor infecciosidade para flebotomíneos. Nos cães sintomáticos e clinicamente doentes há predominância de uma resposta do tipo Th2, com maiores níveis de anticorpos, menor imunidade celular, maior carga

parasitária e maior infecciosidade para flebotomíneos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; REIS et. al., 2010).

Figura 3- Manifestações clínicas e características imunológicas da infecção por *Leishmania infantum* em cães



Fonte: Adaptado de Solano-Gallego e colaboradores (2011).

Sendo assim a LVC é uma doença sistêmica que pode envolver potencialmente qualquer órgão, tecido ou fluido corporal e se manifesta por sinais clínicos inespecíficos. As manifestações clínicas e anormalidades clínico-patológicas mais comuns encontradas no geral são linfadenomegalia generalizada, lesões cutâneas, perda de peso corporal, apetite diminuído ou aumentado, letargia, palidez das membranas mucosas, esplenomegalia, poliúria e polidipsia, febre, vômito, diarreia e entre outros (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BANETH et al., 2008).

As lesões cutâneas são as manifestações mais frequentes que incluem dermatite esfoliativa com ou sem alopecia, dermatite erosiva-ulcerativa, dermatite nodular, dermatite papular, dermatite pustulosa, onicogribose e podem ser vistas juntamente com outros sinais clínicos oculares como blefarite (esfoliativa, ulcerativa ou nodular) e conjuntivite (nodular), ceratoconjuntivite, uveíte anterior/endoftalmite dentre outras alterações clinico patológicas como lesões ulcerativas ou nodulares mucocutâneas e da mucosa (orais, genitais e nasal), epistaxe, claudicação (poliartrite erosiva ou não erosiva, osteomielite, polimiosite), miosite atrófica, doenças vasculares (vasculite sistêmica, tromboembolismo arterial) e problemas neurológicos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A doença renal pode ser a única manifestação clínica da LVC que pode progredir de proteinúria leve para a síndrome nefrótica ou para uma doença renal em estágio terminal. A insuficiência renal crônica é um resultado grave da progressão da doença e a principal causa de mortalidade. Apesar da alta prevalência de patologia renal em cães infectados, a azotemia renal é um achado laboratorial relativamente incomum (ROURA et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

1.3.7 Aspectos histopatológicos da LVC

As principais lesões histopatológicas observadas em cães são hipertrofia e hiperplasia das células do SFM (principalmente do baço, linfonodo, fígado e medula óssea), inflamação crônica na pele, reação inflamatória granulomatosa no fígado e no baço, pneumonia intersticial e glomerulonefrite (MACHADO; HOFFMANN; LANGONI, 2007).

As principais células do SFM parasitadas são macrófagos e células de Kupffer, no entanto, os parasitos do gênero *Leishmania* podem infectar diversos tipos diferentes de células, atingindo células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos, eosinófilos e até mesmo células neoplásicas, podendo estar presentes em quase todos os tecidos e órgãos do corpo, incluindo o sistema nervoso central (SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Embora sejam capazes de parasitar diversas células, os macrófagos são considerados as principais células hospedeiras do parasito e responsáveis por contribuir para sua sobrevivência a longo prazo (SARIDOMICHELAKIS, 2009). A patogênese da LVC está associada primariamente ao quadro imunopatológico que se estabelece em resposta à presença do parasito e/ou mecanismos imunomediados nos diferentes órgãos/tecidos (SARIDOMICHELAKIS, 2009; SILVA, 2007; FERRER, 1999). A resposta inflamatória associada à infecção por *Leishmania* sp., se caracteriza por infiltração e/ou proliferação de macrófagos, histiócitos, linfócitos, plasmócitos e até mesmo neutrófilos e eosinófilos, pode estar presente em linfonodos, medula óssea, baço, fígado, intestino, ossos, sistema genital, pele e mucosas (SARIDOMICHELAKIS, 2009; FERRER 1999).

Considerando a importância da pele como o primeiro ponto de contato com a *Leishmania* spp. durante o processo de infecção, um estudo histopatológico da pele realizado por Barros (2011) demonstrou predominância de infiltrado inflamatório histioplasmocítico, seguido de linfoplasmocítico tanto em cães sintomáticos como assintomáticos. No mesmo estudo, também foram detectadas presenças de formas amastigotas na pele de 42,22% dos

animais com LCV, sendo destes 78,95% sintomáticos e 21,05% assintomáticos. Dessa maneira, as lesões de pele são epidemiologicamente um fator clínico de grande importância, visto que, que cães sintomáticos apresentam maior parasitismo cutâneo o que os torna potencialmente transmissores mais eficientes (LIMA, 2007).

1.3.8 Diagnóstico da LVC

O diagnóstico precoce da LVC é de grande importância para realizar uma terapia precoce e adequada, prevenindo a progressão para doença grave. Os métodos de diagnóstico da LVC estão baseados em três principais categorias: parasitológicos (visando a identificação do parasito); sorológicos (visando a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp.); e moleculares (visando à amplificação do DNA do protozoário) (RIBEIRO et al., 2013b). Considerando que no Brasil resultados falso-positivos podem levar cães não infectados à eutanásia e resultados falso-negativos podem resultar na manutenção de cães infectados sem controle na população, testes diagnósticos com maior acurácia são extremamente importantes (ALVES; BEVILACQUA, 2004). Além disso, uma combinação de diferentes testes também leva a um diagnóstico mais confiável (CHAGAS et al., 2021; RIBEIRO et al., 2019; LOPES et al., 2017).

O diagnóstico clínico é difícil e complexo, pois os sinais clínicos são variáveis e comuns a outras enfermidades (RIBEIRO, 2020; TASCA et al., 2009). Além disso, alguns cães podem ser portadores da infecção por toda a vida ou encontrarem-se em fase de incubação. As alterações encontradas no hemograma, perfil renal e hepático também são inespecíficas (SCHIMMING; SILVA, 2012). Deste modo, a associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos, parasitológicos, sorológicos e moleculares faz-se necessária para o diagnóstico definitivo (FARIA; ANDRADE, 2012).

O diagnóstico sorológico detecta anticorpos IgG anti- *L. infantum* e se dá pelas técnicas de reação imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e testes imunocromatográficos. O teste de ELISA detecta de forma qualitativa e quantitativa os anticorpos presentes no soro, sendo o método mais utilizado no sorodiagnóstico, possuindo sensibilidade variada de 80-100%. A técnica de RIFI também expressa a quantidade de anticorpos circulantes, sendo que resultados com títulos de anticorpos iguais ou superiores a 1:40 o animal é considerado positivo (SILVA; WINCK, 2018). No entanto, animais com diluição de até 1:160 devem ser investigados antes de confirmar a infecção (RIBEIRO et al., 2019). O DPP® (*Dual Path Platform*) é um ensaio imunocromatográfico à base de ouro coloidal

concebido para detectar anticorpos específicos aos antígenos rK9, rK26 e rK39 de *L. infantum* que pode ser aplicado em amostras de sangue total ou de soro e submetido à leitura visual (GRIMALDI et al., 2012). O DPP® (*Dual Path Platform*) Bio-Manguinhos apresenta uma sensibilidade variada entre 85% a 97,9% (RIBEIRO et al., 2019; MENDONÇA et al., 2017b). Apesar da fácil execução e leitura, autores relataram que o teste DPP® apresenta como desvantagem a baixa sensibilidade em animais sem sinais clínicos, porém, pode ser útil para confirmar os cães clinicamente suspeitos, devido a sua elevada especificidade em cães sintomáticos (FARIA; ANDRADE, 2012; GRIMALDI et al., 2012). Além disso, um aspecto importante a ser considerado são reações cruzadas e as coinfeções que podem confundir o diagnóstico da infecção por *L. infantum*. A coinfeção com outras espécies de *Leishmania* (*L. brazilienses*, *L. amazonensis*) e com outros agentes infecciosos (*Babesia* sp, *Ehrlichia* sp, *Trypanosoma cruzi*, *T. caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*) tem sido demonstrada e deve ser cuidadosamente avaliada em cada caso a fim de diferenciar a condição de coinfeção da reação cruzada (RIBEIRO, 2020). Desde 2011, o Ministério da Saúde substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC, passando a ser o DPP® como teste de triagem e o ELISA como teste confirmatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Métodos parasitológicos auxiliam no diagnóstico permitindo a visualização do parasito, por meio de citologia, histologia, cultura de amostras de biópsia de pele, fígado, aspirados de linfonodos, medula óssea, baço. A especificidade destes métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitos não é homogênea no mesmo tecido. Segundo Gontijo e Melo (2004), a sensibilidade mais alta (98%) é alcançada quando se utiliza aspirado do baço.

O diagnóstico molecular é realizado por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou quantitativa (qPCR), a qual detecta DNA do parasito em diversas amostras biológicas. A técnica de PCR tem sido bastante utilizada para o diagnóstico da infecção de cães com LVC, principalmente por apresentar boa sensibilidade e especificidade (CARVALHO et al., 2018), especialmente quando testado por um PCR direcionado para detectar o DNA do cinetoplasto (kDNA) (MARCELINO et al., 2020; SOLANO-GALLEGO et al., 2017). Este método também é usado no monitoramento de cães tratados com medicamentos antiparasitários (CHAGAS et al., 2021; BRUNO et al., 2019; GALLUZZI et al., 2018; MANNA et al., 2008). Sudarshan e Sundar (2014) relataram que através da utilização da técnica de PCR, cães com baixa carga parasitária e que não apresentem manifestações clínicas da

doença poderão ser corretamente diagnosticados (PAZ et al., 2018). Além disso, existem vantagens da utilização da qPCR em relação a PCR convencional, incluindo o menor tempo, com menor risco de contaminação e melhor sensibilidade (MORTARINO et al., 2004).

Um ponto importante a ser considerado é a diferenciação entre animais não infectados sadios, expostos, infectados sadios e infectados doentes. Dessa forma, considerando que nem todos os cães infectados estão doentes, foi proposto um sistema de classificação pelo grupo de estudos sobre LVC no Brasil - Brasileish - que permite a classificação geral dos animais quanto à exposição a *L. infantum*, infecção e doença (Quadro 1) (BRASILEISH, 2018).

Quadro 1- Classificação geral dos animais quanto à exposição a *Leishmania infantum*, infecção e doença.

Classificação	Características
Não infectado sadio	Animal sem sinais clínicos ou alterações laboratoriais, negativo na sorologia, citologia, histologia, PCR e cultura
Exposto	Animal sem sinais clínicos ou alterações laboratoriais, positivo na sorologia (níveis de anticorpos baixos a médios), porém, negativos na citologia, histologia, PCR e cultura
Infectado sadio	Animal sem sinais clínicos ou alterações laboratoriais, positivos na sorologia (níveis de anticorpos de baixos a médios), citologia, histologia/imuno-histoquímica, PCR e/ou cultura
Infectado doente	Animal com sinais clínicos e/ou alterações laboratoriais, positivos para LVC na sorologia (níveis de anticorpos baixos a altos), citologia, histologia, PCR e/ou cultura

Níveis de anticorpos altos: 3-4 vezes o ponto de corte estabelecido pelo laboratório de referência
Fonte: (BRASILEISH, 2018).

1.3.9 Notificação de casos positivos ou suspeitos de LVC

De acordo com o Guia de Bolso de Leishmaniose Visceral Canina do Conselho Federal de Medicina Veterinária (2020), em casos positivos ou suspeitos de LVC, o médico veterinário necessitará fazer a notificação compulsória à autoridade sanitária sob art. 6º, do Decreto nº 51.838, de 14 de março de 1963. A notificação ao Sistema de Saúde também é obrigatória em casos humanos acometidos com a doença, conforme previsto no art. 3º, art 18, e Anexo 1, item 32 da Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública, do Anexo V da Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017.

A notificação dos casos de LV em animais é determinada pelo art 2º, § 1º e item 4.a do Anexo, da Instrução Normativa MAPA Nº 50, de 24 de setembro de 2013, e deve ser realizada mensalmente nas Unidades Veterinárias Locais (UVLs) ou nos escritórios de atendimento à comunidade, nas sedes dos Serviços Veterinários Oficiais dos Estados (SVEs) ou nas Superintendências Federais de Agricultura (SFAs). O Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) ressalta que a notificação é também um dever ético do médico-veterinário, normatizado pelo art. 6º, VII, do Anexo Único, da Resolução CFMV nº 1.138, de 16 de dezembro de 2016 (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2020).

Todo caso canino suspeito, atendido por médico veterinário, deverá ser notificado simultaneamente ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e à respectiva Secretaria Municipal de Saúde. Os exames sorológicos confirmatórios são realizados nos laboratórios centrais estaduais (LACENs) ou nos Centros de Controle de Zoonoses (CCZs) municipais. O CCZ de Florianópolis, SC, engloba uma série de procedimentos a partir de um resultado positivo de um cão. Os veterinários clínicos responsáveis entram em contato com o tutor, explicando sobre a doença, o tutor pode optar pela realização do tratamento, em caso de recusa do tratamento é obrigatória a realização da eutanásia do animal, sendo esta realizada pelo CCZ ou por um Médico Veterinário escolhido pelo tutor. A partir do momento em que o tutor opta pelo tratamento, o CCZ solicita um termo de acompanhamento do veterinário responsável pelo tratamento; exames de qPCR para avaliação quantitativa da carga parasitária a cada 6 meses; comprovante de compra do medicamento Milteforan®; castração do animal, bem como orienta sobre o uso da coleira repelente (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE SANTA CATARINA, 2021).

1.3.10 Tratamento

Os fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (Sbv), antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), desoxicolato de anfotericina B (AmB), pentamidina e miltefosina (MIL) (BRASIL, 2017; SOARES-BEZERRA et al., 2004). No Brasil, o tratamento de cães comprovadamente diagnosticados com LVC é permitido desde 2016 (Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS da Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008), dentre os fármacos leishmanicidas, apenas fármacos de uso veterinário registrados para esse fim no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O único fármaco leishmanicida atualmente autenticado e permitido é

o Milteforan® (miltefosina), sob número SP 000175-9.000003, de propriedade da empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2016).

O licenciamento do medicamento foi emitido respeitando-se as determinações da Portaria Interministerial nº1.426 de 11 de julho de 2008, que regulamentou o tratamento de cães, proibindo tratamento da LVC com leishmanicidas de uso humano ou não registrados no MAPA (BRASILEISH, 2018). Os objetivos do tratamento da LVC incluem a remissão de sinais clínicos e alterações laboratoriais, redução da carga parasitária e infecciosidade, modular a resposta imune celular (Th1) e controlar/reduzir a resposta imune humoral.

A Virbac Laboratories lançou o Milteforan® (miltefosina) no mercado veterinário Europeu no ano de 2007, com a finalidade de tratar cães com LVC, sendo aprovado para uso na região do Mediterrâneo. A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é classificada como um medicamento antitumoral (UNGER et al., 1989) e seu potencial leishmanicida foi identificado na década de 80 (DAGA; ROHATGI; MISHRA, 2021; CARNIELLI et al., 2019). Seu composto é o primeiro medicamento oral anti-*Leishmania*, que foi estudado em parceria com a OMS e registrado como eficaz para o tratamento de infecções causadas por *L. donovani* em humanos (CROFT; SNOWDON; YARDLEY, 1996). Sua administração em cães é por via oral, SID (uma vez ao dia) a cada 24 horas, durante 28 dias, na dosagem de 2 mg por kg de peso vivo do animal, de acordo com o fabricante. Apesar de não ter seu mecanismo de ação totalmente elucidado, sabe-se que a miltefosina atua inibindo a biossíntese do receptor de glicosil fosfatidil inositol (GPI), molécula chave para sobrevivência intracelular da *Leishmania* spp. Também atua interferindo na síntese de fosfolipase e proteína quinase C, que são *Leishmania*-específicas. A ação metabólica desse composto pode afetar a biossíntese de glicolipídeos e glicoproteínas de membrana do parasito, causando apoptose. Outros estudos sugeriram que esta droga também tem propriedades imunomoduladoras (NOGUEIRA et al., 2019; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016).

Entretanto, assim como outros fármacos, a miltefosina tem apresentado problemas em relação à resistência em cepas de *Leishmania* spp. (COELHO et al., 2012). A resistência aos fármacos está cada vez mais frequente e muitas vezes pode ser remetida a um desenvolvimento natural do indivíduo. A resistência à miltefosina mediada por mutações no complexo MT/Ros3, foi identificada em isolados considerados na literatura como totalmente resistentes à miltefosina (BULTÉ et al., 2021; SRIVASTAVA et al., 2017).

Com o propósito de aumentar a efetividade do tratamento, utilizam-se terapias combinadas que consistem no uso de mais de um fármaco com atividades sinérgicas ou aditivas a fim de potencializar o espectro de atividade e a eficácia terapêutica (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Além disso, diversos estudos relataram a possibilidade de combinar fármacos com a imunoterapia no combate à leishmaniose (SHAKYA et al., 2012; KHALILI et al., 2011).

O alopurinol é um análogo da hipoxantina, sendo hidrolisado pelo parasito numa molécula idêntica à inosina. É incorporado no lugar do ATP durante a síntese do ácido ribonucleico (RNA), interrompendo a síntese proteica normal (NASCIMENTO, 2015; RIBEIRO, 2007). Devido a esse mecanismo de atuação, possui uma atividade leishmanioestática e baixa toxicidade (MANNA et al., 2008; RIBEIRO, 2007), além de possuir baixo custo e a possibilidade de administração oral (IKEDA-GARCIA et al, 2010; BANETH; SHAW, 2002). Estudos mostraram que quando administrado isoladamente em período mínimo de 60 dias induz gradativamente a remissão dos sinais clínicos e os níveis de anticorpos específicos circulantes (NASCIMENTO, 2015; IKEDA-GARCIA et al, 2010; VERCAMMEN et al., 2002 KOUTINAS et al., 2001). Seus efeitos colaterais estão ligados a produção de cálculos de xantina, sua administração é realizada por via oral, BID (duas vezes ao dia), a cada 12 horas, na dosagem de 10-15 mg/kg, podendo ser utilizado por 180 dias ou por tempo indeterminado.

A domperidona tem ação imunomoduladora e é um antagonista dos receptores de dopamina, que provoca liberação de serotonina, estimulando a produção de prolactina (OLIVA et al., 2010; GÓMEZ-OCHOA et al., 2009), e a produção de linfócitos Th1 (imunidade celular) e de IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α , levando à ativação dos macrófagos seguida da diminuição da população de Th2 (TRAVI, et al., 2018). A administração de domperidona em cães saudáveis na dose de 0,5 a 1,1 mg/kg/dia durante 30 dias aumentou o grau e a duração da atividade fagocítica até 30 dias após o final da administração do fármaco (GÓMEZ-OCHOA et al., 2009; NASCIMENTO, 2015).

Alguns estudos têm demonstrado que a vacina contra a LVC associada ou não a outros fármacos têm o mesmo índice de cura em relação ao tratamento padrão, reduzindo o número de fármacos e conseqüentemente reduzindo os efeitos colaterais (MAYRINK et al., 2006). A vacina é administrada em um total de três doses com intervalos de vinte e um dias e induz uma resposta imunitária celular caracterizada por atividade de linfócitos Th1 no período de três semanas após a primeira dose, que conseqüentemente reduz a carga parasitária de *L. infantum*

nos macrófagos conforme demonstrado *in vitro* (NASCIMENTO, 2015; MORENO et al., 2012).

A escolha do protocolo de tratamento baseia-se no estado geral de cada paciente, levando sempre em consideração o seu estado clínico e exames laboratoriais, como função renal, hepática e proteínas séricas. O grupo de estudos Brasileiro de Leishmaniose Visceral Canina (Brasileish) classifica a LVC em quatro estádios da doença, com o objetivo de ajudar o médico veterinário a determinar a terapia adequada, formular um prognóstico e implementar etapas de acompanhamento para o manejo do cão com leishmaniose (Quadro 2).

Quadro 2 - Estadiamento clínico, manejo e tratamento da leishmaniose visceral canina baseado na sorologia, sinais clínicos e achados laboratoriais.

Estádios clínicos	Sorologia ¹	Sinais clínicos	Resultados laboratoriais	Terapia ²	Prognóstico
Estádio I Sem doença	Positiva com níveis de anticorpos baixos a médios/ parasitológico negativo	Ausente	Sem alterações	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴	Bom
Estádio II Sem Doença/ Doença leve	Negativa ou positiva com níveis de anticorpos baixos a médios/ parasitológico positivo	Sinais clínicos ausentes a leves, como linfadenopatia periférica, dermatite papular, emagrecimento discreto	Geralmente sem alterações. Perfil renal normal	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina	Bom
Estádio III Doença moderada	Positiva com níveis de anticorpos baixos a altos/ parasitológico positivo	Sinais do estágio II, além de outros como lesões cutâneas difusas ou simétricas, onicogribose, ulcerações, anorexia e emagrecimento	Anemia não regenerativa leve, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade do soro (proteínas totais >12 g/dl) oriundos da formação de imunocomplexos, tais como uveíte e glomerulonefrite. Subestádios a) Perfil renal normal (creatinina <1,4 mg/dl; RPC <0,5 b) Creatinina <1,4 mg/dl; RPC = 0,5-1	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da nefropatia e controle PSS	Bom a reservado

Estádio IV Doença grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos/ parasitológico positivo	Sinais do estágio III, além de sinais originários de lesões por imunocomplexos: vasculite, artrite, uveíte, glomerulonefrite	Alterações do estágio III, além de DRC no estágio 1 (RPC > 1) ou 2 (creatinina 1,4-2 mg/dl) da IRIS	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Reservado a pobre
Estádio V Doença muito grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos/ parasitológico positivo	Sinais do estágio IV, além de tromboembolism o pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio final	Alterações do estágio IV, além de DRC no estágio III (creatinina 1,1-5 mg/dl) e IV (creatinina >5 mg/dl) da IRIS, ou síndrome nefrótica (marcada proteinúria com RPC >5)	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da nefropatia e controle PSS	Pobre

Abreviações: RIFI (reação de imunofluorescência indireta); DRC (doença renal crônica); IRIS (International Renal Interest Society); PSS (pressão sistêmica sanguínea); RPC (razão proteína-creatinina urinárias).

¹Em cães soronegativos ou com níveis de anticorpos baixos ou médios, a infecção deve ser confirmada por meio de citologia, histologia, imuno-histoquímica e/ou PCR. Níveis altos de anticorpos (aumento de 3-4 vezes acima do ponto de corte ou cut-off pré-estabelecido de um laboratório de referência) são conclusivos para o diagnóstico da leishmaniose canina (SOLANO-GALLEGOS et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013b).

²Monitorar a cada 4 a 6 meses com exames sorológicos, parasitológicos e/ou moleculares, exames gerais para estadiamento e revisão de tratamento (RIBEIRO, 2016).

³Imunoterapia com a vacina Leish-Tec®: um frasco aos 0, 14 e 28 dias em animais infectados (TOEPP et al., 2018) ou dois frascos nos dias 0, 21 e 42, em monoterapia ou associada ao alopurinol, com reforços semestrais (RIBEIRO et al., 2013, 2017).

⁴Imunomodulação com domperidona: 0,5-1 mg/kg duas vezes ao dia por 30 dias (GÓMEZ-OCHOA et al., 2009).

Fonte: adaptado de Solano-Gallego e colaboradores (2011) e Brasileish (2018).

1.3.11 Prevenção e controle

As atuais medidas de prevenção da LVC baseiam-se em um conjunto de estratégias, como controle vetorial integrado à educação em saúde, a realização de diagnóstico precoce, o uso de coleiras inseticidas, a identificação, o monitoramento e o tratamento dos cães infectados descrito no tópico 1.3.10 (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2020).

Em relação a vacinação, a única vacina atualmente regulamentada para uso no Brasil é a *Leish-Tec*®, uma vacina recombinante, licenciada sob o Nº 9.270/2007 em 24/01/2007, a qual apresenta eficácia vacinal em torno de 71,4% (REGINA-SILVA et al., 2016) e está indicada apenas para a prevenção da doença e deve ser usada somente em cães assintomáticos com

resultados sorológicos negativos, obtidos por meio de kits diagnósticos registrados no MAPA (art. 6º, § 7º, do Anexo da Instrução Normativa Interministerial MAPA/MS nº 31, de 10 de julho de 2007) (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2020). O protocolo vacinal indicado para cães a partir dos quatro meses de idade, baseia-se em três doses com intervalos de 21 dias e primeiro reforço um ano após a primeira dose e anualmente. (RIBEIRO; PINTO, 2020; DANTAS-TORRES et al., 2020)

As medidas de prevenção que visam impedir o contato do cão com o inseto vetor de *L. infantum* se baseiam no uso de coleiras impregnadas com inseticida, sendo está a medida de proteção de primeira linha para fins de saúde pública (DANTAS-TORRES et al., 2020). O uso de coleiras tem demonstrado maior impacto em populações caninas em que a taxa de transmissão da infecção é menor com o uso de coleiras e pode ser uma medida de controle eficiente em áreas endêmicas (LOPES et al., 2018; REITHINGER et al., 2004). A vacina é ainda aplicada de forma opcional para a proteção individual dos cães (DANTAS-TORRES et al., 2020). As coleiras com efeito repelente contra flebotomíneos contém piretróides sintéticos, permetrina ou deltametrina (OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013; GAVGANI et al., 2002). O uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% reduziu efetivamente a incidência de cães com LVC (ALVES et al., 2020). Esses produtos estão disponíveis em formulação tópica (pipetas, spray) ou em forma de coleira e reduzem o risco de novas infecções e picada de flebotomíneos em cães já infectados, sendo a eficácia desses produtos demonstrada na redução da incidência de LVC como uma medida de saúde pública em estudo realizado por Yimam e Moheballi (2020). No Brasil, um estudo realizado por Sevá e colaboradores (2016), demonstrou que o uso de coleiras inseticidas foi a medida mais eficaz para o controle do LVC dentre as outras medidas de controle. Devido ao hábito crepuscular e noturno do inseto vetor, manter o cão dentro de casa, do anoitecer ao amanhecer também é uma medida eficiente de prevenção a picadas de flebotomíneos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

O controle ambiental do vetor deve ser feito por meio de gestão ambiental (limpeza e reorganização de áreas peridomiciliares), adoção de medidas de proteção individual (redes para portas e janelas, uso de mosquiteiros impregnados de inseticidas em alta áreas de risco) e o uso de inseticidas no meio ambiente em situações especiais (risco de epidemias, transmissão intradomiciliar) (RIBEIRO et al., 2013b). As atividades de repelência, incluindo óleo de *neem*, citronela, linalol e geraniol, também foram testadas contra flebotomíneos com níveis de eficácia satisfatórios (MULLER et al., 2008).

3.12 Eutanásia de cães soropositivos

No Brasil, a estratégia preconizada como controle da infecção do reservatório canino no Programa Nacional de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PNVCLV) é a eutanásia de cães soropositivos, entretanto esta medida é cada vez mais questionável, devido aos resultados controversos dos estudos que avaliam a eficiência desta medida de saúde pública (COSTA, 2011). Além disso, em estudo realizado por Assis e colaboradores (2020), onde realizaram uma análise de custo efetividade de um programa baseado em coleiras impregnadas com inseticidas em comparação com as estratégias tradicionais (eutanásia, controle químico do vetor) de controle da LV utilizadas no Brasil, demonstraram que o uso de coleiras foi considerado o mais eficiente e mais barato na prevenção da LVC em comparação aos demais.

Dantas-Torres e colaboradores (2019) conduziram uma revisão do controle da leishmaniose canina no contexto de Saúde Única e apontaram diversas razões científicas pelas quais a eutanásia de cães é inaceitável, dentre elas, não há nenhuma evidência de que a eutanásia de cães reduz a incidência de LV (ROMERO; BOELAERT, 2010; GONZÁLEZ et al., 2015). Alguns autores acreditam que hospedeiros reservatórios alternativos podem desempenhar um papel na manutenção do ciclo de vida de *L. infantum* (FERREIRA et al., 2018; MAIA; DANTAS-TORRES; CAMPINO, 2018). Além disso, os cães sacrificados são rapidamente substituídos por outros cães, que costumam ser mais suscetíveis à infecção primária (NUNES et al., 2010).

Ferramentas de diagnóstico sorológico frequentemente usadas para rastrear cães têm limitações em termos de sensibilidade e especificidade, como por exemplo, reatividade cruzada com outras espécies de *Leishmania* spp. e/ou outros tripanosomatídeos (SILVA et al., 2011; TRAVI et al., 2018). Dessa forma, o controle eficaz da transmissão de *L. infantum* requer abordagens integradas com foco não apenas no cão como fonte indireta, mas também no parasito e no vetor flebotomíneo (GÁLVEZ et al., 2018).

1.3.13 Importância do estudo

Florianópolis é uma área endêmica para a LVC desde 2010, na qual o vetor *L. longipalpis* não foi amostrado em estudos da fauna de flebotomíneos conduzidos no município até o momento. No entanto, a soroprevalência relatada para *L. infantum* em cães é de 3,5% de acordo com o CCZ municipal (DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2020). Vários fatores podem explicar o aumento do número de casos de LVC no município, tais

como a grande população de cães de rua e a elevada taxa de reposição de animais pelos tutores, o desmatamento e a ocupação da ilha de forma desordenada, levando ao deslocamento de animais infectados para diferentes localidades e dificultando as ações do programa de controle da LV.

Em vários estudos, foi demonstrado que a pele é o tecido canino com os maiores níveis de carga parasitária (CHAGAS et al., 2021; REIS et al., 2013). Além disso, as cargas parasitárias da pele podem ser usadas como um marcador da capacidade infecciosa de cães para vetores flebotômicos (NOGUEIRA et al., 2019; BORJA et al., 2016). Dessa forma, o emprego da técnica de qPCR vem sendo utilizado no monitoramento de cães tratados com Milteforan®, sendo possível o acompanhamento da carga parasitária nos tecidos dos animais, durante e após o período de tratamento (CARVALHO et al., 2018; REIS et al., 2013; ANDRADE et al., 2011; QUARESMA et al., 2009). Estudos já demonstraram que a variação na carga parasitária na pele dos cães está relacionada com a capacidade infectante para o vetor, tornando essa amostra biológica um potencial biomarcador para avaliar o poder infectante dos cães, apesar disto, não está estabelecido em termos quantitativos qual seria a carga parasitária infectante (NOGUEIRA et al., 2019; BORJA et al., 2016).

Considerando que, após tratamento da LVC apenas alguns animais são considerados clinicamente curados, não incorrendo em cura parasitológica, os cães podem permanecer assintomáticos, tornando-se importantes reservatórios no contexto da transmissão de *L. infantum* (SOLANO-GALLEGO et al., 2004). Além disso, sucessivos ciclos ineficazes de tratamento levam ao risco da seleção de linhagens de parasitos resistentes a drogas, com evidente perigo à saúde humana (COELHO et al., 2012).

Diante disso, o conhecimento prévio e monitoramento da infecção em cães serve como alerta para o início de ações de controle e prevenção da ocorrência de casos humanos. Portanto, sabendo que os casos caninos antecedem o aparecimento de casos humanos (FRAGA et al., 2012; GRIMALDI et al., 2012) o estudo para o acompanhamento de cães tratados com miltefosina em diferentes bairros de Florianópolis é de extrema importância para a saúde pública, visto que a LV é uma zoonose grave e que apresenta diversas limitações relacionadas ao tratamento tanto de casos humanos quanto caninos.

Em Santa Catarina, nenhum estudo foi realizado avaliando a eficácia do tratamento de cães naturalmente infectados e vivendo nos domicílios. Florianópolis faz parte de um cenário epidemiológico da LV peculiar do ponto de vista geográfico (a maior parte da cidade encontra-se localizada na porção insular) e ausência do vetor clássico, *Lu. longipalpis*. Sabe-se muito

pouco sobre a variabilidade genética do parasito, variedade e distribuição de hospedeiros e outras características relacionadas que podem direta ou indiretamente influenciar na resposta dos cães infectados e no risco da manutenção do ciclo do parasito após tratamento desses animais.

Sendo assim, as hipóteses desse estudo foram: a) os cães naturalmente infectados por *L. infantum* em Florianópolis e tratados com Milteforan® e associações terapêuticas apresentam melhora nos parâmetros clínicos, parasitológicos e histopatológicos; b) a amostra biológica de linfonodo é eficiente para o diagnóstico e isolamento do parasito.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros clínicos, parasitológicos e histopatológicos de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, no município de Florianópolis, antes e após o tratamento com Milteforan®.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I- Avaliar o estado clínico dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes e após o tratamento com Milteforan® a partir da sintomatologia, parâmetros hematológicos e bioquímicos.
- II- Isolar e caracterizar a(s) espécie(s) de *Leishmania* dos cães antes e após o tratamento com Milteforan®.
- III- Determinar a carga parasitária em biópsias de pele de cães portadores de LVC antes e após o tratamento com Milteforan®.
- IV- Investigar a associação entre a carga parasitária e parâmetros clínicos, histopatológicos e os diferentes esquemas terapêuticos empregados para o tratamento de cães portadores de LVC.
- V- Validar a utilização da amostra biológica de linfonodo para o diagnóstico de *L. infantum*.

3. METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos realizados nos animais estão de acordo com as normas e regulamentos do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Esse projeto foi submetido e aprovado pelo CEUA da UFSC, protocolado sob o CEUA nº 6251290719.

3.2 ANIMAIS SELECIONADOS PARA O ESTUDO

Para avaliação da eficácia do tratamento os cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. selecionados para o estudo foram encaminhados pelo Centro de Controle de Zoonose (CCZ) do município de Florianópolis e por médicos veterinários de clínicas veterinárias particulares que atendem e realizam tratamento para LVC. Para participação dos cães no estudo, o pré-requisito foi que os animais apresentassem diagnóstico positivo para infecção por *Leishmania* sp. Para os animais encaminhados pelo CCZ foram considerados positivos aqueles sororreagentes em testes recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral/Ministério da Saúde do Brasil, a saber: teste rápido *Dual Path Platform* (TR DPP®) e ensaio imunoenzimático *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Os animais encaminhados por clínicas particulares apresentaram testes parasitológicos e/ou sorológicos positivos realizados por laboratórios privados. Para todos os cães selecionados foram coletadas amostras biológicas de sangue, punção de linfonodo poplíteo e biópsia de pele íntegra, conforme o item 3.4.

Numa segunda etapa, os tutores e médicos veterinários responsáveis por cães positivos infectados que optaram pelo tratamento foram convidados a colaborar com o estudo. Após o consentimento do tutor (Anexo 1), as amostras biológicas foram coletadas em três momentos: tempo 0 (T0) - correspondente ao dia antes do início do tratamento; tempo 1 (T1) - correspondente a 31 dias após o início do tratamento com Milteforan® e tempo 2 (T2) - correspondente a 6 meses após fim do tratamento com Milteforan®. Foram coletadas amostras de 24 cães no T0 e T1 e 11 cães no T2, sendo que para três cães não foi possível realizar o acompanhamento do T2: dois cães devido a mudança de domicílio para outro estado e um cão devido a óbito antes da coleta do T2. Os demais cães com coletas a serem realizadas referem-se a cães cujo tratamento teve início há menos de seis meses. Todos os cães incluídos no estudo foram cães naturalmente infectados por *L. infantum* e vivendo em domicílios, uma vez que este estudo não utilizou cães de forma experimental, não houve um grupo placebo. Dessa forma

todos os cães participantes tiveram amostras coletadas antes do tratamento no T0, sendo estabelecido o T0 de cada cão seu próprio controle.

O protocolo de tratamento mínimo utilizado neste estudo foi baseado na administração do medicamento Milteforan® por via oral, SID (uma vez ao dia) a cada 24 horas, durante 28 dias, na dosagem de 2 mg por kg de peso vivo do animal de acordo com o fabricante VIRBAC, sendo o custo e a administração do tratamento de total responsabilidade do tutor ou médico veterinário responsável por cada caso.

A combinação de outros medicamentos foi utilizada em alguns animais fazendo com que diferentes esquemas terapêuticos fossem seguidos de acordo com o profissional que acompanhava cada cão (Tabela 1). Além do Milteforan®, a maioria dos cães (75%) utilizaram associação medicamentosa com o Alopurinol (Ziloric®) por via oral, BID (duas vezes ao dia), a cada 12 horas, durante 180 dias ou uso contínuo, na dosagem de 10-15 mg/kg de peso vivo. Dezesete cães (70%) fizeram uso de domperidona por via oral, BID (duas vezes ao dia), a cada 12 horas, durante 30 dias, na dosagem de 0,5 mg/kg a 1,1 mg/kg de peso vivo. Além disso, 12,5% os cães passaram por imunoterapia após o ciclo do Milteforan®, com a vacina *Leish-Tec*® (CEVA Saúde Animal, Brasil), utilizando dose dupla da vacina com intervalo de 21 dias completando três aplicações, com repetição a cada seis meses. Foi considerado para o esquema terapêutico 1 os cães tratados com a combinação dos medicamentos Milteforan®, alopurinol e domperidona, enquanto que os animais que receberam apenas Milteforan®, Milteforan® combinado com alopurinol ou Milteforan® combinado com imunoterapia foram incluídos no grupo de cães com esquema terapêutico 2.

Tabela 1 - Protocolo terapêutico recebido por cada cão positivo para leishmaniose visceral canina participante do presente estudo.

Nº Cão UFSC	Medicamento	Associação	Duração	Associação	Duração	Imunoterapia	Associação
1	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	60 dias	Não	Ômega 3
2	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	60 dias	Não	-
3	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	60 dias	Não	-
4	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	60 dias	Não	Ômega 3
5	Milteforan®	-	-	-	-	Sim	-
6	Milteforan®	Alopurinol	30 dias	Domperidona	180 dias	Sim	Marbofloxacina

7	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	-	-	Não	-
8	Milteforan®	-	-	-	-	Não	-
9	Milteforan®	-	-	-	-	Não	-
10	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	60 dias	Não	-
11	Milteforan®	-	-	-	-	Não	-
12	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	60 dias	Não	-
13	Milteforan®	Alopurinol	60 dias	Domperidona	60 dias	Não	-
14	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	90 dias	Não	-
15	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	30 dias	Não	-
16	Milteforan®	Alopurinol	30 dias	Domperidona	30 dias	Não	Ômega 3
17	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	90 dias	Não	-
18	Milteforan®	Alopurinol	60 dias	Domperidona	30 dias	Não	-
19	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	60 dias	Não	-
20	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	6 meses	Sim	-
21	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	60 dias	Não	-
22	Milteforan®	Alopurinol	180 dias	Domperidona	60 dias	Não	-
23	Milteforan®	-	-	-	-	Não	-
24	Milteforan®	-	-	-	-	Não	-

3.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os cães que participaram do estudo foram monitorados e avaliados clinicamente por um médico veterinário. Foi preenchida uma ficha clínica com anexo de fotografias do animal no T0 (antes do tratamento), T1 (31 dias após o início do tratamento) e no T2 (6 meses após o fim do tratamento). Dentre os sinais clínicos avaliados incluiu-se: coloração das mucosas, ceratoconjuntivite, opacidade da córnea, blefarite, uveíte, alopecia, dermatite, hiperpigmentação de pele, despigmentação de pele, edema de patas, paraparesia, onicogribose, linfadenopatia, falta de apetite, vômito, diarreia, lesão na ponta da orelha, hepatomegalia e esplenomegalia (palpável) e miotrofia facial. Além disso, para os animais no T0 também foram coletadas informações de exames laboratoriais realizados para avaliar as condições hematológicas e bioquímicas do animal (função renal, hepática, albumina, globulina e proteínas totais). Com o conjunto de dados clínicos e laboratoriais completos os animais do T0 foram classificados em uma escala de escores de “1” a “5” pontos, sendo: escore 1 (um) animal com sinal clínico leve e o escore 5 (cinco) animal com sinal clínico acentuado (baseado nos critérios

propostos pelo grupo Brasileish - <https://www.brasileish.com.br/>). Devido à ausência dos exames laboratoriais nos tempos T1 e T2, não foi possível seguir de forma precisa o estadiamento do Brasileish. Assim, o estadiamento realizado nestes tempos, foi apenas baseado nos sinais clínicos e carga parasitária.

Um segundo grupo amostral foi utilizado para a avaliação da amostra biológica de linfonodo para diagnóstico e isolamento do parasito. Além das amostras dos cães em tratamento foram incluídas amostras de cães eutanasiados pelo CCZ. O laboratório de protozoologia em parceria com o CCZ de Florianópolis realiza necropsias de animais com LVC eutanasiados pelo CCZ, com finalidade de estudar os aspectos clínicos da doença, realizar isolamento do parasito, diagnóstico parasitológico e molecular e avaliar a distribuição da doença no município. No presente trabalho, os dados referentes aos isolamentos de parasitos em meio de cultivo a partir de necropsias de 75 cães infectados realizadas no período de 2014 a 2019 foram compilados.

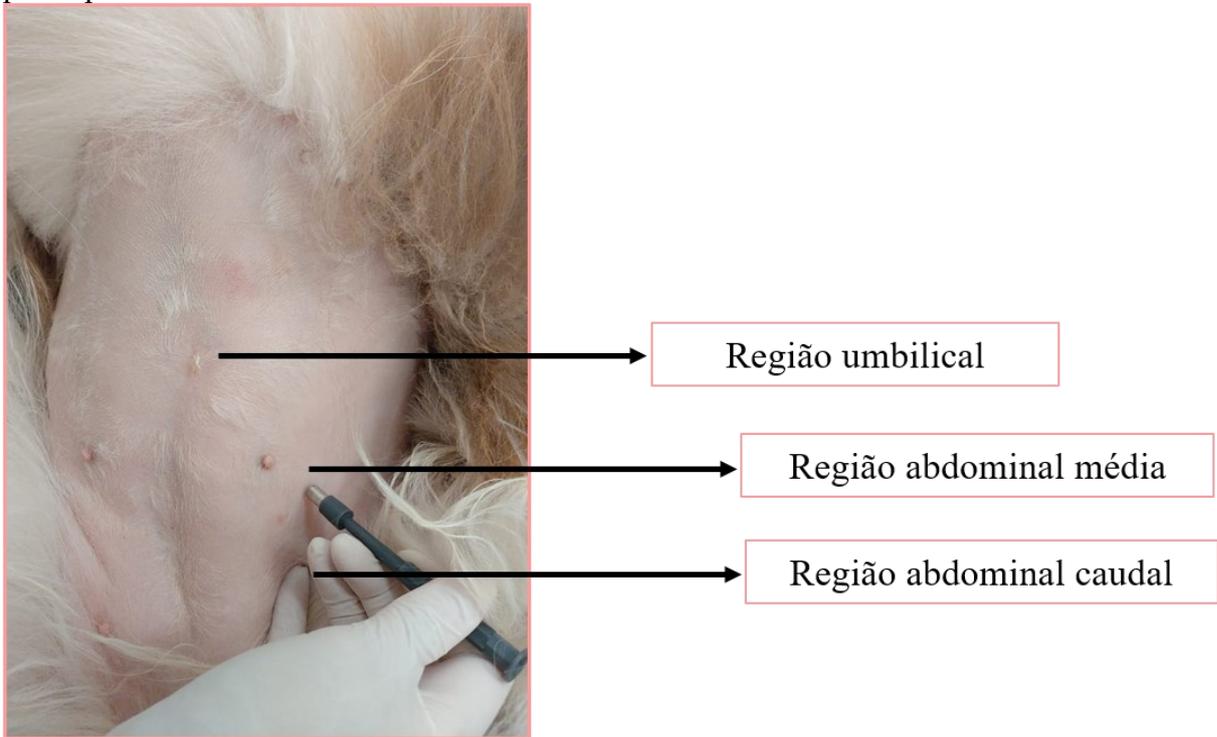
3.4 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

3.4.1 Cães em tratamento

3.4.1.1 Biópsias de pele

Primeiramente, o cão foi posicionado em decúbito dorsal e realizou-se tricotomia da pele íntegra da região abdominal média esquerda do cão com lâmina de aço inoxidável descartável, seguida por assepsia e anestesia local com lidocaína a 2%. Posteriormente, foram coletados dois fragmentos de pele desta região utilizando *punch* de 5 mm de diâmetro (Figura 4). As amostras foram segmentadas e armazenadas nas soluções de formol (10%) para análises histopatológicas e em etanol 70% para os exames parasitológicos e qPCR (CHAGAS, 2019). Um segmento foi utilizado para preparação de lâminas por aposição para posterior coloração.

Figura 4 - Representação esquemática do local de realização das biópsias de pele dos cães participantes do estudo.



Fonte: Autora (2022).

3.4.1.2 Punção de linfonodo poplíteo

Após a palpação local e identificação do linfonodo poplíteo foi realizada a assepsia do local, utilizando solução de clorexidina 2%. Uma agulha de 13 x 0,45 mm (26G ½) em seringa de 1ml foi introduzida no linfonodo para retirada de aproximadamente 10 µl de aspirado de linfonodo, que foi dividido em três frações. Uma fração foi gotejada em lâmina de vidro para realização do esfregaço por extensão, que após seca foi armazenada em temperatura ambiente para posterior coloração. A segunda fração foi separada em um tubo e armazenada em gelo para posterior extração de DNA. O restante do material da seringa foi transferido para tubos contendo 1 ml de meio de cultivo Schneider (Sigma-Aldrich), pH 7,4, suplementado com 5% de soro bovino fetal inativado (SBF – Gibco), 5% de urina humana masculina e 150 µl de antibióticos (estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 500 U/ml e gentamicina 40 mg/ml) e armazenados em estufa a 26,5 °C durante 6 dias para isolamento do parasito em cultura.

3.4.2 Cães eutanasiados

Nas necropsias foram coletadas amostras aspirativas de linfonodo, medula, baço, fígado para isolamento do parasito em cultura. As amostras de punção aspirativa foram transferidas para um tubo contendo meio de cultura enriquecido com Schneider com 5% de soro bovino fetal e incubadas a 26,5 °C. Estes procedimentos foram realizados previamente a este trabalho, ocorrendo nas respectivas datas de eutanásias dos cães no período de 2014 a 2019. Os dados referentes aos isolamentos ficam arquivados no Laboratório de Protozoologia.

3.5 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

3.5.1 Pesquisa direta do parasito através de microscopia óptica (MO)

Os esfregaços feitos por extensão a partir do aspirado de linfonodo e por aposição do fragmento de pele em lâminas de vidro foram corados utilizando o método Panótico Rápido® (Laborclin), conforme as recomendações do fabricante. Após secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram imersas por 20 segundos em fixador sob leve agitação, depois em corante básico e corante ácido. Após lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente, as lâminas foram examinadas por microscopia óptica em objetiva de 100X para verificar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. (FERREIRA et al., 2012).

3.5.2 Isolamento de formas promastigotas de *Leishmania* spp.

O tubo contendo meio de cultivo e a fração da amostra de linfonodo foi acompanhado semanalmente, sendo considerado positivo quando observadas formas promastigotas de *Leishmania* spp. ao microscópio óptico. Quando não ocorreu o aparecimento de formas flageladas depois de seis semanas, a cultura foi considerada negativa e descartada. As amostras isoladas foram criopreservadas e depositadas no banco de cepas do Laboratório de Protozoologia da UFSC.

3.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

3.6.1 Extração de DNA a partir de amostras biológicas

A extração do DNA das amostras biológicas de pele coletadas dos animais foi realizada com o kit de purificação Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) ou DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN®), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Para a extração de DNA genômico, os fragmentos de pele de aproximadamente 5mm foram pesados e cortados com lâmina de bisturi nº 24 e macerados por pistilos e colocados em um microtubo com a solução de lise de núcleo. Após incubação de 30 minutos a 65 °C, foi adicionado 17,5 µl de proteinase K a 20 mg/ml por 16 horas a 56 °C. Foi adicionado 3 µl de solução de RNase a 4 mg/ml sendo mantido por 30 minutos a 37 °C, seguido pela solução de precipitação de proteínas. Após centrifugação o sobrenadante foi precipitado com álcool isopropílico (Merck) e o precipitado contendo o DNA lavado em etanol 75% gelado (Fmaia). O DNA de cada amostra foi adicionado de 50 µl de água livre de DNases/RNases e mantido a 65 °C por 1 hora.

3.6.2 Quantificação de DNA por espectrofotometria

As concentrações e pureza dos DNAs extraídos foram determinadas por espectrofotometria a 260, 280 e 320 nm em Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer. As amostras foram então diluídas para uma concentração de 10 ng/µl e estocadas à -20°C para posteriores análises.

3.6.3 Identificação da espécie de *Leishmania* presente nos cães portadores de LVC

A caracterização da espécie é importante em localidades onde ocorrem simultaneamente, a leishmaniose cutânea e a leishmaniose visceral. A técnica “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (RFLP) ou polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição de produtos de PCR pode ser utilizada para identificação de algumas espécies de *Leishmania*, utilizando uma ou mais enzimas de restrição que cortam o DNA em sítios específicos. Nesse estudo, a PCR-RFLP do *ITS1* foi utilizada para a identificação do parasito nas amostras biológicas oriundas dos cães portadores de LVC.

Para realização da técnica, o DNA extraído da pele de cada cão foi utilizado para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 350 pb da região do *ITS* utilizando iniciadores LITSR 5’ CTGGATCATTTTCCGATG 3’ e L5.8S 5’

TGATACCACTTATCGCACTT 3' (SCHONIAN et al., 2003). Para cada reação utilizou-se solução tampão 5x (Promega), 0,2 mM dNTP (mix), 10 pmol de cada iniciador, 5 U/ μ l de GoTaq® DNA polimerase (Promega), 2 μ l de DNA molde em um volume final de 25 μ l. A amplificação ocorreu em termociclador de DNA (Applied Biosystems) alternando 33 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, ligação dos iniciadores a 53° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% corado por brometo de etídeo (10 mg/ml). As amostras que apresentaram a banda específica de 350 pb foram submetidas a digestão utilizando a enzima *HaeIII* (Promega). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 μ l, contendo 1 μ l de *HaeIII* (10 U/ μ l), 1,5 μ l de tampão da enzima (10 X) e 12,5 μ l de produto de PCR. A mistura foi então incubada a 37 °C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de poliacrilamida 10%, corados por brometo de etídeo (10 mg/ml) e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) (QUARESMA et al., 2011).

3.6.4 Quantificação da carga parasitária por qPCR

O DNA extraído de culturas da cepa referência de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) foi utilizado para construir a curva padrão da qPCR. Os parasitos foram quantificados usando uma câmara de Neubauer e um total de $2,3 \times 10^7$ parasitos foi utilizado para a extração de DNA. A partir da dosagem do DNA resultante foram realizadas diluições seriadas de 10 vezes para chegar ao equivalente a 10^0 parasitos.

A quantificação da carga parasitária, utilizando a técnica de qPCR, foi baseada no protocolo realizado por Chagas e colaboradores (2021), sendo esse adaptado conforme os equipamentos e materiais disponíveis no Laboratório de Protozoologia (UFSC). A técnica é baseada no uso de agente intercalante de DNA como sistema de detecção.

As reações de qPCR foram preparadas com os iniciadores 150: 5'(C/G)(C/G)(G/C)CC(C/A)CTAT(T/A)TTACACCAACCCC 3' e 152: 5' GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA 3', dirigidos à região conservada do kDNA de *Leishmania* e que amplificam um fragmento de 120 pb (DEGRAVE et al., 1994). Para cada reação foram adicionados 0,3 μ l de cada iniciador a uma concentração de 10 pmoles/ μ l, 5 μ l de GoTaq® qPCR Master Mix 2X (Promega), 0,1 μ l de CRX Reference Dye a 30 μ M (Promega), 2,0 μ l de DNA a uma concentração de 10 ng/ μ l, 2,3 μ l de água deionizada (Promega) para completar o volume final da reação de 10 μ l. A placa

MicroAmp® foi selada e colocada no equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), com as seguintes etapas: um ciclo de desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos para completa desnaturação, 60 °C por 1 minuto com aquisição da fluorescência neste momento. Após o período de amplificação, a curva de dissociação foi realizada com uma ciclagem adicional cuja temperatura aumenta de 60 °C a 95 °C a uma taxa de 0,3 °C por segundo, com aquisição de fluorescência contínua.

Para a análise final, o limite de detecção se deu no 32º ciclo (*cut-off*). O fluoróforo BRYT Green® (Promega) foi utilizado como agente intercalante do DNA, permitindo quantificar o produto de PCR amplificado a cada ciclo da reação. Os resultados foram obtidos e analisados utilizando o programa Sequence Detection Systems 2.4 (Applied Biosystems). Para todas as amostras, foram avaliados parâmetros e resultados, como a curva de dissociação, a intensidade de fluorescência a cada ciclo e a quantificação do número de cópias de DNA conforme a equação estabelecida pela curva padrão com as quantidades de parasitos conhecidos. Em seguida, de acordo com protocolo proposto por Rolão e colaboradores (2004), a quantidade de DNA detectada foi convertida em número de parasitos/miligrama de tecido (pele). Basicamente, usando um fator de correção, esse número de parasitos foi normalizado pela quantidade de tecido utilizado na extração de DNA, juntamente com o volume no qual este DNA foi diluído para seu uso nas reações, sendo o resultado final reportado em quantidade de cópias de parasitos/mg de tecido e posteriormente transformados em logaritmos naturais (Ln) (TUPPERWAR et al., 2008, ROLÃO et al., 2004).

3.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A análise histomorfológica sistemática das amostras teciduais foi realizada em colaboração com a Dra. Carolina Reck (VERTÀ Laboratórios) e o Prof. Dr. Álvaro Menin (CCR/UFSC – Campus Curitibanos). Fragmentos de pele integra da região abdominal coletados dos cães acompanhados nesse estudo destinados ao exame histopatológico foram encaminhados ao VERTÀ Laboratórios veterinários (<https://verta.vet.br/>) para a análise histomorfológica e parasitológica. As amostras de pele foram fixadas em solução de formalina 10% tamponada em PBS (pH 7,2-7,4), desidratadas em concentrações crescentes de etanol, embebidas em parafina, seccionadas (4 µm) em micrótomo semiautomático e coradas pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) e Giemsa histológico. Após a montagem, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico e as imagens registradas digitalmente. Os fragmentos

de pele foram então sistematicamente avaliados quanto à intensidade e tipo da resposta inflamatória em derme, epiderme e anexos. O padrão da resposta inflamatória foi definido através da análise de 10 campos em objetiva de 40x. Paralelamente, foram identificados e contabilizados macrófagos contendo amastigotas de *L. infantum* em citoplasma.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com “n” amostral de 24 cães nos tempos T0 e T1 e 11 cães tiveram os três tempos de coletas finalizados no tempo T2. Para a investigação da associação entre o estado clínico (quantificado pelos valores de estadiamento) e a carga parasitária, nos diferentes tempos de monitoramento dos cães, antes (T0) e após a administração do Milteforan® (T1 e T2), foi utilizado o teste estatístico não-paramétrico de Friedman (para as amostras contendo T0, T1 e T2), o qual compara três ou mais grupos de dados pareados ou vinculados, ou seja, quando os mesmos indivíduos são avaliados mais de uma vez e o teste de Wilcoxon (para as amostras contendo apenas T0 e T1), que é semelhante ao teste de Friedman, entretanto é utilizado quando se pretende comparar apenas dois grupos pareados. O teste post-hoc de Dunn foi utilizado para comparações múltiplas em conjunto com o de Friedman, para avaliar a significância entre os diferentes tempos. Inicialmente, os valores de cada conjunto pareado foram ranqueados em ordem crescente. Dessa maneira, cada conjunto foi ranqueado separadamente. Posteriormente, foi feita a soma dos rankings de cada conjunto. Quando a soma dos valores de cada conjunto apresenta valores muito diferentes, o valor de p tende a ser pequeno. Nesse sentido, rejeita-se a hipótese de que as diferenças das distribuições dos grupos sejam devidas ao acaso.

Para a análise da associação entre carga parasitária e diferentes esquemas terapêuticos utilizados para o tratamento dos cães (esquema terapêutico 1) e (esquema terapêutico 2) os dados foram organizados em dois grupos (1 e 2) para os tempos T1 e T2. Nesse caso, as amostras não foram pareadas pois não foi feita comparação da carga parasitária entre diferentes tempos. Então, usou-se o teste t não pareado para avaliar se houve diferença significativa na carga parasitária entre os cães esquema terapêutico 1 e os que realizaram esquema terapêutico 2.

Todas as análises foram realizadas considerando um nível de significância de 5%, portanto, um intervalo de confiança de 95% e as diferenças assumidas como significativamente estatísticas quando o valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS CÃES

No presente estudo, 24 cães com LV foram acompanhados antes e após o tratamento nos diferentes tempos (T0, T1) e 11 cães no tempo (T2). Destes cães, 16 eram machos e 8 eram fêmeas. A maior parte dos animais tratados não tinha raça definida 17/24 (67%), o restante dos cães (33%) foi distribuído nas seguintes raças: dois pastor-alemão, dois *border collie*, um *golden retriever*, um labrador e um *shitzu*. A faixa etária dos cães acompanhados variou entre cinco meses e 12 anos de idade. A maior parte dos cães tratados se encontrava na faixa etária de zero a quatro anos (52%), seguido de cães de cinco até oito anos de idade (30%) e por fim, cães com mais de 8 anos (18%). A média das idades dos cães tratados foi de 5,2 anos. Em relação à pelagem dos cães, a maioria (58%) tinha pelo curto, 29% apresentavam pelo médio e 13% tinha pelo longo. Em relação ao porte dos cães, a maioria (66%) era de porte grande, 17% porte médio e 17% porte pequeno. Já em relação ao domicílio, 54% dos cães viviam no peridomicílio, ou seja, aqueles que ficavam exclusivamente no exterior dos domicílios, 29% viviam no intradomicílio, ou seja, viviam exclusivamente no interior dos domicílios e 17% eram semidomiciliados, ou seja, tinham acesso tanto na parte externa como na parte interna dos domicílios (Apêndice 1).

Os cães acompanhados habitam dois municípios da grande Florianópolis (Florianópolis e São José). No município de Florianópolis foram incluídos cães sororreagentes dos bairros: Armação (n=1), Barra da Lagoa (n=1), Cacupé (n=1), Canto da Lagoa (n=2), Costeira do Pirajubaé (n=1), Daniela (n=1), Ingleses (n=1), Itacorubi (n=6), João Paulo (n=1), Praia da Joaquina (n=1), Rio Tavares (n=2), Rio Vermelho (n=2), Saco dos Limões (n=1), Sambaqui (n=1) e Vargem do Bom Jesus (n=1), enquanto que no município de São José, foi incluído um cão do bairro Picadas do Sul (n=1) (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição geográfica dos cães com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral incluídos como participantes deste trabalho nos municípios de Florianópolis e São José, Santa Catarina.



Fonte: adaptado de Google (2022).

Todos os 24 cães incluídos no trabalho foram clinicamente avaliados quanto a presença e a intensidade de 23 distintos sinais clínicos encontrados na LVC. Vinte cães acompanhados no presente estudo apresentaram sinais clínicos comumente relatados para LVC (84%), e quatro animais não apresentaram sintomatologia (16%). Os resultados de intensidade sintomatológica foram registrados através de uma escala de pontuação de zero a cinco atribuída a cada sinal clínico. Posteriormente, para cada cão foi realizada a somatória da pontuação obtida para todos os sinais clínicos e então obteve-se a média da pontuação clínica de todos os cães avaliados nos diferentes tempos. A pontuação clínica média antes do tratamento foi de 14,54 pontos, e após tratamento no T1 foi de 11,29 pontos e no T2 foi de 7,45 pontos. Sendo assim, seis meses após

o início do tratamento os cães mostraram uma redução na média da pontuação clínica de 14,54 para 7,45 pontos (Apêndice 2).

Os sinais clínicos mais frequentes encontrados antes do tratamento foram linfadenopatia (83%), onicogribose (75%), lesão na ponta da orelha (62%) e hiperqueratose (54%) (Figura 6). A redução dos sinais clínicos dos animais foi evidente na maioria dos cães após o tratamento (T1 e T2) (Tabela 2), principalmente os sinais de linfadenopatia, dermatite, alopecia e hiperqueratose. Neste estudo observamos uma melhora nos sinais clínicos de lesão na ponta da orelha e onicogribose, no entanto esses sinais clínicos tiveram uma recuperação mais lenta em comparação com os demais sinais clínicos. Sendo assim, foi possível observar uma melhora clínica evidente nos cães avaliados após o tratamento (T1 e T2), demonstrando uma eficácia do tratamento com Milteforan® na regressão dos sinais clínicos da doença (Figura 7).

Figura 6 - Sinais clínicos da LVC mais frequentes encontrados nos cães com leishmaniose visceral avaliados no presente estudo antes do início do tratamento com Milteforan®.



Observa-se linfadenomegalia do linfonodo poplíteo (A); lesão na ponta da orelha (B); onicogribose (C); hiperqueratose (D).

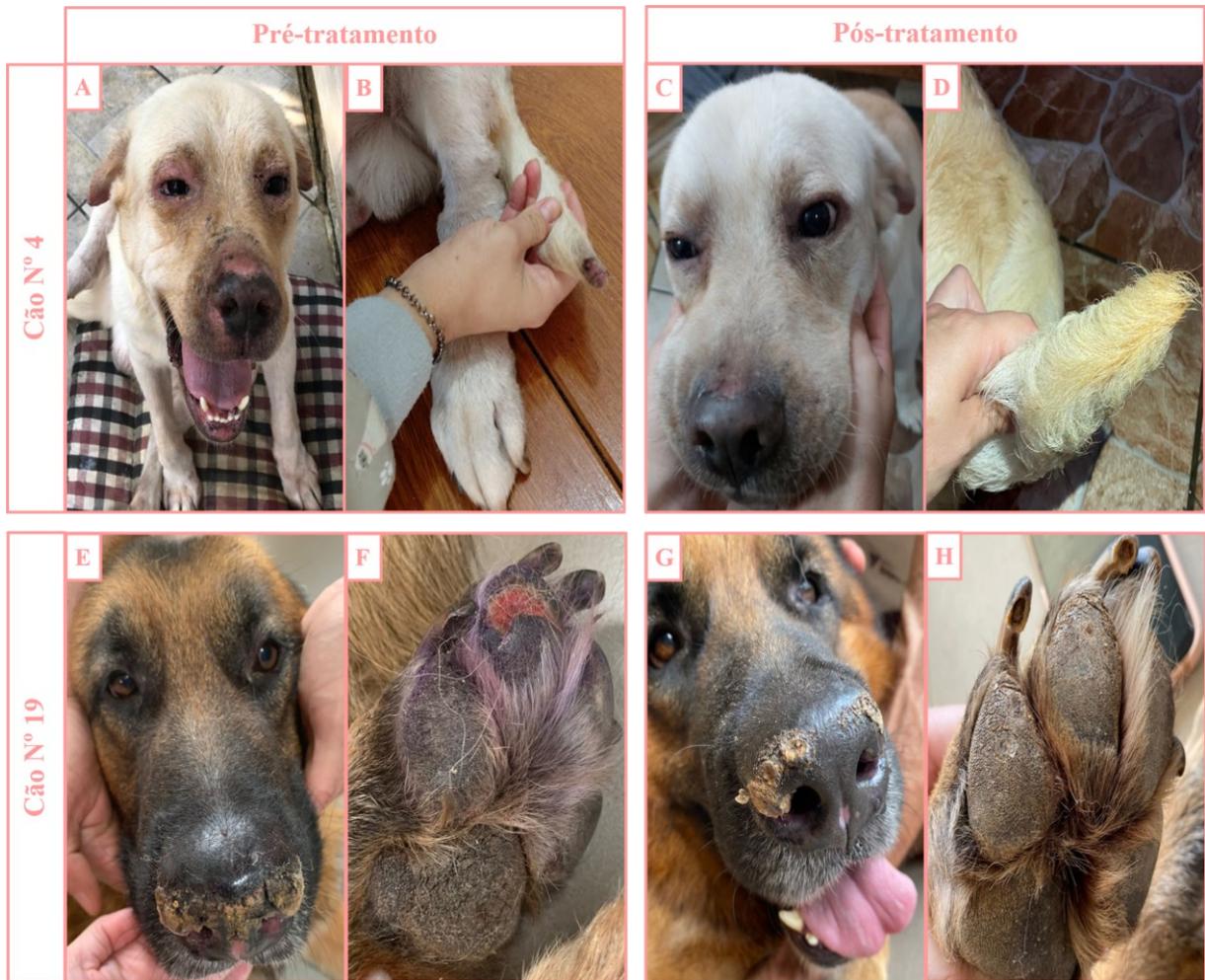
Fonte: Autora (2021).

Tabela 2 - Porcentagem de cães com diagnóstico de leishmaniose visceral acometidos com os diferentes sinais clínicos comumente relatados para a doença.

Sinais clínicos	Cães acometidos		
	T0 (n=24)	T1 (n=24)	T2 (n=11)
	%	%	%
Mucosa hipocorada	45	33	12
Conjuntivite	33	20	0
Opacidade da córnea	0	0	0
Blefarite	33	12	0
Uveíte	12	12	0
Alopecia	45	37	20
Dermatite	50	41	20
Hiperpigmentação	16	16	12
Despigmentação	8	8	0
Hiperqueratose	54	41	12
Descamação	25	25	0
Edema patas	20	20	12
Problema locomotor	16	12	8
Onicogribose	75	75	54
Linfadenopatia	83	33	37
Falta apetite	4	12	0
Epistaxe	0	0	0
Vômito	0	16	0
Diarreia	0	4	0
Lesão ponta da orelha	62	62	50
Hepatomegalia	12	12	9
Esplenomegalia	8	8	9
Miotrofia facial	25	25	20

Os animais foram avaliados antes (T0), 31 dias após a primeira dose do tratamento com o Milteforan® (T1) e 6 meses após o fim do tratamento (T2).

Figura 7 - Sinais clínicos de LVC encontrados em dois cães avaliados antes e após tratamento com Milteforan®.

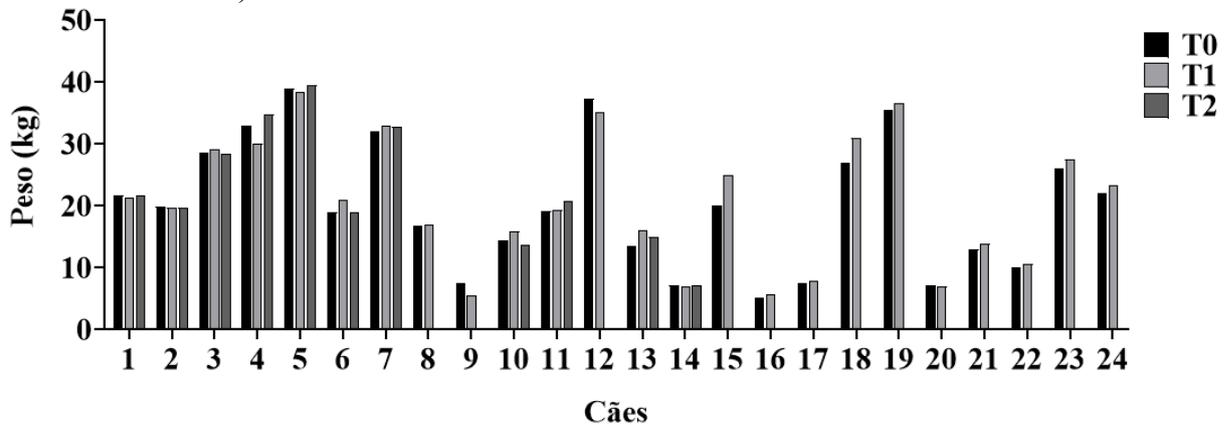


Cão número 4 antes do tratamento (A) e (B) e após tratamento no tempo 2 (C) e (D). Cão de número 19 antes do tratamento (E) e (F) e após tratamento no tempo 1 (G) e (H). Cão número 4 com lesões de pele, lesões de ponta de orelha, blefarite, conjuntivite, hiperqueratose nasal, alopecia na ponta do rabo, antes do tratamento no tempo zero (A) e (B), cão 4 melhora dos sinais clínicos após tratamento no tempo dois (D) e (C), cão 19 com hiperqueratose nasal e hiperqueratose de coxins antes do tratamento no tempo zero (E) e (F), cão 19 com melhora dos sinais clínicos após tratamento no tempo um (G) e (H).

Fonte: Autora (2021).

Os pesos corporais dos cães foram registrados e comparados nos diferentes tempos (T0, T1 e T2). Imediatamente após o tratamento (T1), 66,67% dos cães apresentaram aumento de peso, enquanto 33,33% apresentaram uma diminuição do peso vivo. Em relação ao período de 6 meses após o fim do tratamento (T2), 54,55% dos cães apresentaram um aumento de peso e 45,45% uma diminuição do peso vivo, quando comparado com o período pré-tratamento (T0) (Figura 8).

Figura 8 - Peso dos cães com diagnóstico de leishmaniose visceral avaliados antes (T0) e após o tratamento com Milteforan® (T1- 31 dias após início do tratamento e T2 – 6 meses após o fim do tratamento).



Para os cães de número 8 e 12 não foi possível realizar o acompanhamento do T2, devido à mudança de domicílio para outro estado. O cão número 9 veio a óbito antes da coleta do T2. Os demais cães com pesagem incompleta referem-se a cães cujo tratamento teve início há menos de seis meses.

Os cães no T0 foram avaliados de acordo com o protocolo de estadiamento clínico proposto pelo Brasileish (2018), que permite a classificação dos cães em cinco estádios clínicos da doença, baseados nos exames parasitológicos, exames clínicos, exames hematológicos e bioquímicos. Os dados hematológicos e bioquímicos dos cães avaliados estão disponibilizados no Apêndice 3. Os cães no T1 e T2 foram classificados de acordo com sinais clínicos e carga parasitária. Sendo assim, todos os cães foram classificados nos diferentes tempos (Tabela 3), sendo possível observar uma melhora na avaliação dos estádios clínicos, após o tratamento com o medicamento Milteforan®. Antes do tratamento, a maioria dos cães se encontrava nos estádios clínicos II (38%) e III (33%). Logo após o tratamento (T1), 55% dos cães foram classificados no estágio I e 33% no estágio II. Após 6 meses de tratamento (T2), 73% dos cães já se encontravam classificados no nível de estadiamento I, 18% no estágio II e 9% no estágio IV (Figura 9).

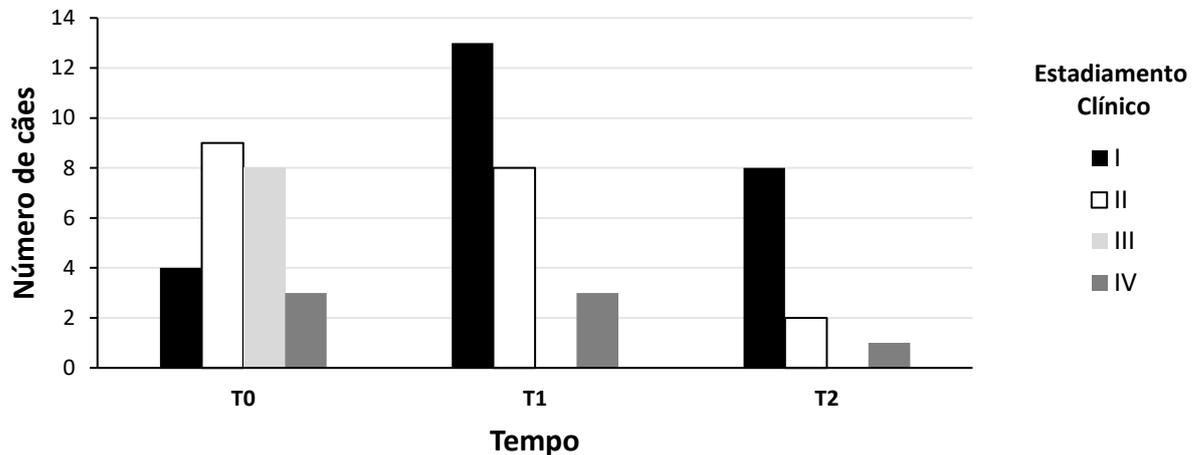
Tabela 3 - Estadiamento clínico dos cães com diagnóstico de leishmaniose visceral em Florianópolis antes do tratamento com Milteforan® (T0), 31 dias após a primeira dose do tratamento (T1) e 6 meses após o fim do tratamento (T2).

	T0		T1		T2	
	Nº de cães	%	Nº de cães	%	Nº de cães	%
Estádio I	4	17	13	55	8	73
Estádio II	9	38	8	33	2	18

Estádio III	8	33	0	0	0	0
Estádio IV	3	12	3	12	1	9
Estádio V	0	0	0	0	0	0
Total	24	100%	24	100%	11	100%

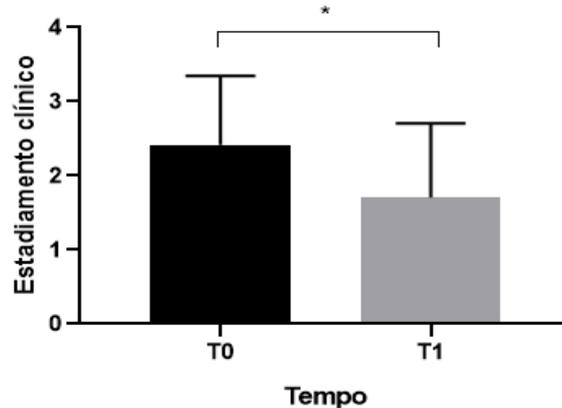
Estádio I: sem doença; Estádio II: sem doença/doença leve; Estádio III: doença moderada; Estádio IV: doença grave; Estádio V: doença muito grave. Classificação de acordo com as diretrizes do Brasileish, 2018 no tempo T0 e nos demais tempos T1 e T2 classificação adaptada.

Figura 9 - Distribuição de cães com diagnóstico de leishmaniose visceral avaliados antes (T0) e após o tratamento com Milteforan® (T1- 31 dias após início do tratamento e T2 – 6 meses após o fim do tratamento) de acordo com os níveis de estadiamento clínico.



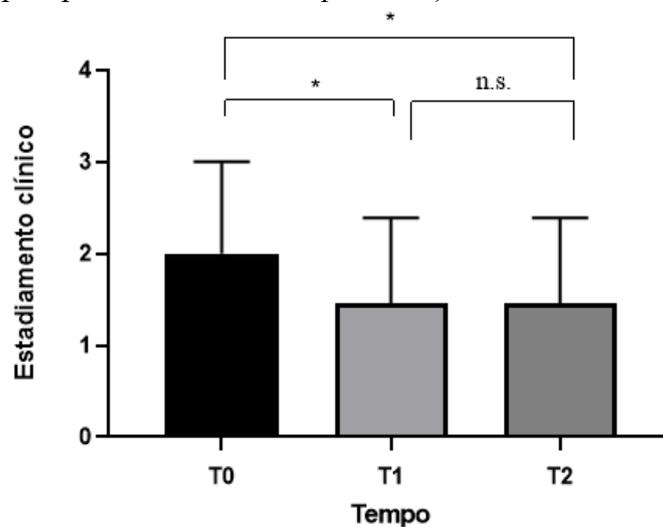
Os valores médios do estadiamento clínico foram significativamente menores nos cães logo após serem submetidos ao tratamento com o Milteforan® (T1) em comparação com os animais avaliados antes do tratamento (T0) ($p < 0,05$ - Figura 10) evidenciando melhora clínica dos animais tratados. Além disso, os valores de estadiamento observados após decorridos seis meses do fim do tratamento dos cães continuaram baixos quando comparados aos estádios observados antes do tratamento (Figura 11), indicando que o medicamento apresentou eficácia na diminuição dos níveis de estadiamento dos cães analisados. Em contrapartida, não houve diferença entre os níveis de estadiamento clínico dos cães avaliados nos diferentes tempos após tratamento (T1 e T2) demonstrando que, após o fim do tratamento, os animais mantêm ao longo de seis meses níveis de estadiamento menores em relação aos observados antes de terem sido tratados.

Figura 10 - Comparação do estadiamento clínico de cães com LVC antes e após a administração de Milteforan® (T0 = antes do tratamento; T1 = 31 dias após a primeira dose do tratamento) ($p < 0,05^*$, Teste de Wilcoxon $W=0$).



Foram considerados para a análise estatística a média dos estadiamentos clínicos em cada tempo ($n=24$) e o desvio padrão.

Figura 11 - Comparação do estadiamento clínico de cães com LVC antes e após a administração de Milteforan® (T0 = antes do tratamento; T1 = 31 dias após a primeira dose do tratamento; T2 = 6 meses após o fim do tratamento) ($p < 0,05$ teste de Friedman $F=9,57$; teste de comparações múltiplas post-hoc de Dunn = $p < 0,05^*$).



n.s = não significativo

Foram considerados para a análise estatística a média dos estadiamentos clínicos em cada tempo ($n=11$) e o desvio padrão.

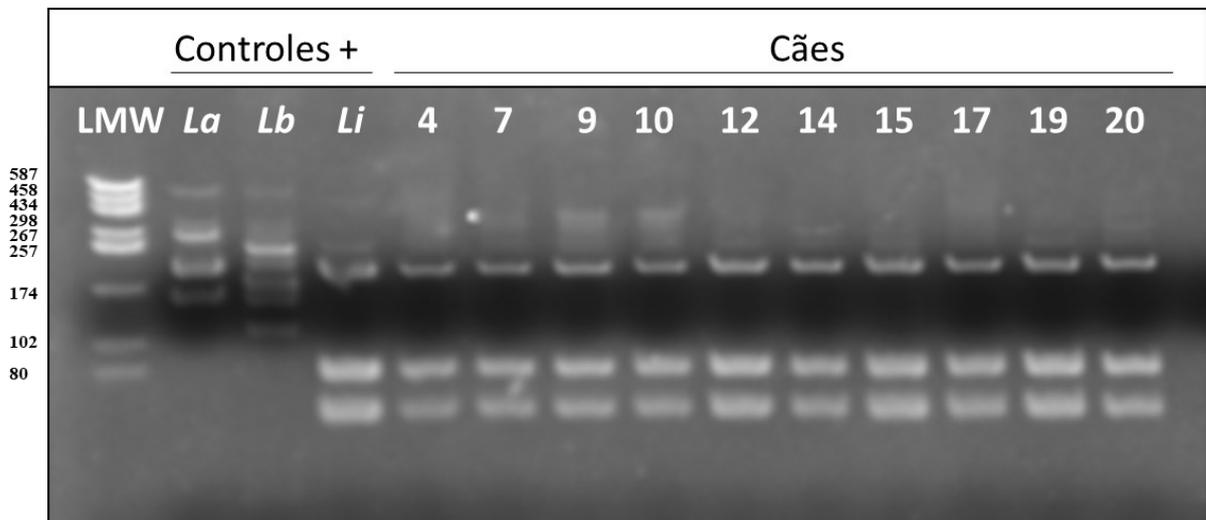
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DOS ISOLADOS DE *Leishmania sp.* DOS CÃES UTILIZADOS NO PRESENTE ESTUDO.

Das 24 amostras de aspirado de linfonodo coletadas no T0 foi possível realizar o isolamento do parasito em cultura das amostras de 17 cães, o que corresponde a 71% do total

de amostras utilizadas no estudo. Das 24 amostras coletadas no T1 foi possível isolar o parasito em 41% das amostras. E das 11 amostras coletadas no T2 foi possível isolar o parasito em 18% das amostras.

Para a confirmação da espécie de *Leishmania* todas as amostras de DNA obtidas dos fragmentos de pele foram submetidas à PCR-RFLP baseada na amplificação do marcador *ITS1* seguida de digestão com a enzima de restrição *HaeIII*. O perfil de bandas obtido para cada amostra foi comparado com os controles de diferentes espécies de *Leishmania* e confirmou que todos os cães avaliados no estudo estavam infectados pela espécie *L. infantum* (Figura 12).

Figura 12 - Resultado representativo do perfil da digestão com *HaeIII* do marcador *ITS1* amplificado a partir de DNA obtido de amostras de pele dos cães infectados diagnosticados com leishmaniose visceral.



Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio. LMW: Padrão de peso molecular (low molecular weight) – pUC18 digerido com *HaeIII* (587-80 pb); *La*: cepa padrão *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); *Lb*: cepa padrão *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); *Li*: cepa padrão *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); 4, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20: amostras de DNA provenientes de fragmentos de pele de cães de número correspondentes, coletados antes do tratamento com Milteforan®.

Fonte: Autora (2022).

4.3 AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum* NOS DIFERENTES TEMPOS PRÉ E PÓS TRATAMENTO COM MILTEFORAN®.

Todos os 24 cães avaliados neste estudo apresentaram diminuição da carga parasitária logo após o primeiro ciclo de tratamento (T1 = 31 dias após a primeira dose do tratamento com Milteforan®) em relação ao T0 (antes do tratamento com Milteforan®) (Tabela 4). Nos cães 1, 2, 8, 10, 11, 13, 16, 19, 21 e 23 houve redução completa da carga parasitária, ou seja, não foi possível detectar material genético de *Leishmania* spp. por qPCR, após o tratamento com

Milteforan® (T1). Dos 24 animais do estudo, foi possível realizar o monitoramento clínico e as coletas em todos os tempos de acompanhamento (T0, T1 e T2) apenas para os cães 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 e 14. As amostras dos cães 1, 2 e 10 se mantiveram com carga parasitária não detectável no T2, e os cães 3, 4, 5 e 7 apresentaram redução na carga em T2 comparativamente a T1. Apenas o cão 11 apresentou um aumento na carga parasitária após seis meses do tratamento com Milteforan®. A coleta de amostras relacionada ao tempo T2 ainda não foi realizada para os cães de números 15 a 24 porque não decorreu o período de seis meses pós tratamento até o momento. Os cães de número 8 e 12 também não foi possível realizar o acompanhamento do T2 devido a mudança de domicílio para outro estado e o cão 9 devido a óbito antes da coleta do T2.

Os resultados demonstram que a qPCR, realizada a partir de amostras de fragmentos de pele, foi eficiente tanto para a detecção quanto para quantificação de *L. infantum*, permitindo o monitoramento do tratamento da LVC independentemente do estado clínico do animal. A utilização de fragmentos de pele como fonte de DNA para a avaliação da carga parasitária dos cães, permitiu a quantificação dos parasitos, mesmo com valores muito discrepantes entre as diferentes amostras, sendo que, as cargas parasitárias encontradas no estudo variaram de zero até 85.523.884 parasitos/mg (tabela 4).

Tabela 4 - Carga parasitária na pele dos cães com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral antes e após o tratamento com Milteforan® avaliada por qPCR.

Nº Cão UFSC	Carga parasitária (Nº parasitos/mg tecido)			Redução/Aumento da carga parasitária (%)	
	T0	T1	T2	T1 em relação ao T0	T2 em relação ao T0
1	533.437	ND	ND	100,00%	100,00%
2	1.991	ND	ND	100,00%	100,00%
3	62.089	3.105	ND	94,99%	100,00%
4	85.523.884	11.053	4.202	99,98%	99,99%
5	19.185	5.257	3.158	72,59%	83,53%
6	791.608	334	1.998	99,95%	99,74%
7	57.821.296	3.521.316	539.733	93,91%	99,06%
8	1.573	ND	-	100,00%	-
9	49.678.490	3.222.755	-	93,51%	-
10	1.904.211	ND	ND	100,00%	100,00%
11	4.599	ND	33.510	100,00%	728,63%
12	16.863.255	41.770	-	99,75%	-
13	48.928.000	ND	ND	100,00%	100,00%

14	16.504.370	1.896.106	45.994	88,51%	99,72%
15	18.806.153	7.376.765	-	60,77%	-
16	38.240	ND	-	100,00%	-
17	47,164	14.080	-	70,14%	-
18	1.991.644	469	-	99,97%	-
19	51.599.00	ND	-	100,00%	-
20	6.607.889	11.123	-	99,83%	-
21	289.059	ND	-	100,00%	-
22	13.079.390	2.159	-	99,98%	-
23	225	ND	-	100,00%	-
24	64.267	16.192	-	74,80%	-

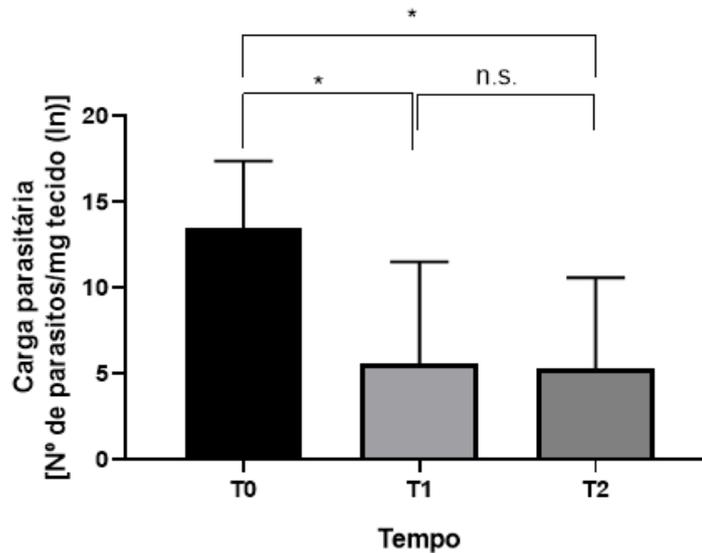
ND = Não detectado. O “-” corresponde as amostras que ainda serão coletadas

T0 = antes do tratamento; T1 = 31 dias após a primeira dose do tratamento com Milteforan®; T2 = 6 meses após o fim do tratamento. Os resultados de valores de Ct obtidos foram transformados em número de parasitos por miligrama de tecido cutâneo de acordo com o recomendado no artigo proposto por Rolão e colaboradores (2004). Não foi possível realizar o acompanhamento do T2 para alguns cães devido: 8 e 12, mudança de domicílio para outro estado; cão 9, óbito antes da coleta do T2; os demais cães ainda estão no intervalo entre T1 e T2.

Para a comparação da carga parasitária média dos cães entre os intervalos de tempo após a administração do Milteforan® foi realizado o teste de Friedman, da qual, demonstrou que a carga parasitária, após o tratamento (T1 e T2) com Milteforan®, foi significativamente menor do que antes do tratamento ($p < 0,05$) (Figura 13a), indicando que o medicamento apresentou eficácia na diminuição da carga parasitária dos cães analisados ($n=11$). Esse resultado foi corroborado pelo teste estatístico de Dunn, realizado subsequente ao teste de Friedman, na qual, a carga parasitária após o tratamento foi significativamente menor do que antes, independentemente do tempo avaliado (T1 e T2). Além disso, não houve diferença estatística na variação da carga parasitária do T1 em relação ao T2, indicando neste estudo, uma manutenção duradoura na baixa carga parasitária após o tratamento (Figura 13b).

Figura 13 - Comparação da carga parasitária média na pele de cães com leishmaniose visceral (n=11), obtida por qPCR, antes e após o tratamento com Milteforan®.

A)



B)

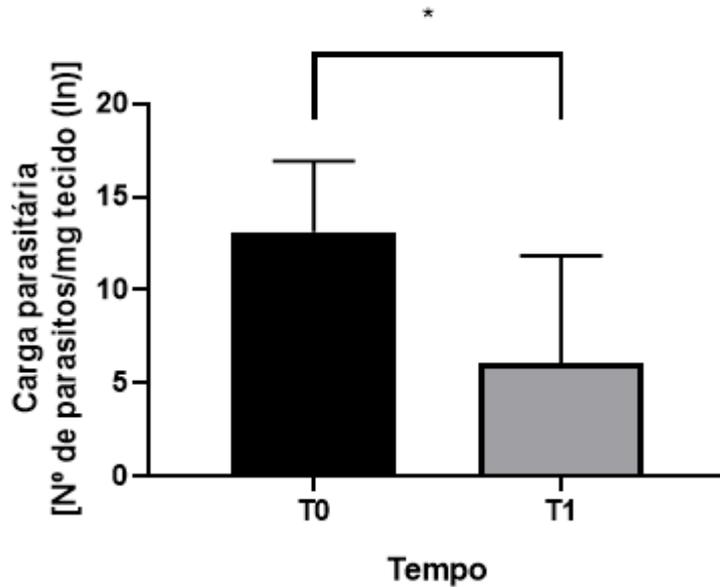
Teste de comparações múltiplas (Teste de Dunn)	Diferença entre médias	Valor de <i>p</i>
T0 x T1	11,86	0,010
T0 x T2	12,41	0,006
T1 x T2	0,5455	0,9999 (NS)

NS = Não significativo

T0 = antes do tratamento; T1 = 31 dias após a primeira dose do tratamento; T2 = 6 meses após o fim do tratamento. Análises estatísticas foram realizadas com a média e desvio padrão de um “n” amostral de 11 cães, através do teste de Friedman 15,20; $p < 0,05$ (A) e comparações pareadas pelo teste de post-hoc de Dunn (B) cujos valores de *p* e * estão demonstrados na tabela e figura.

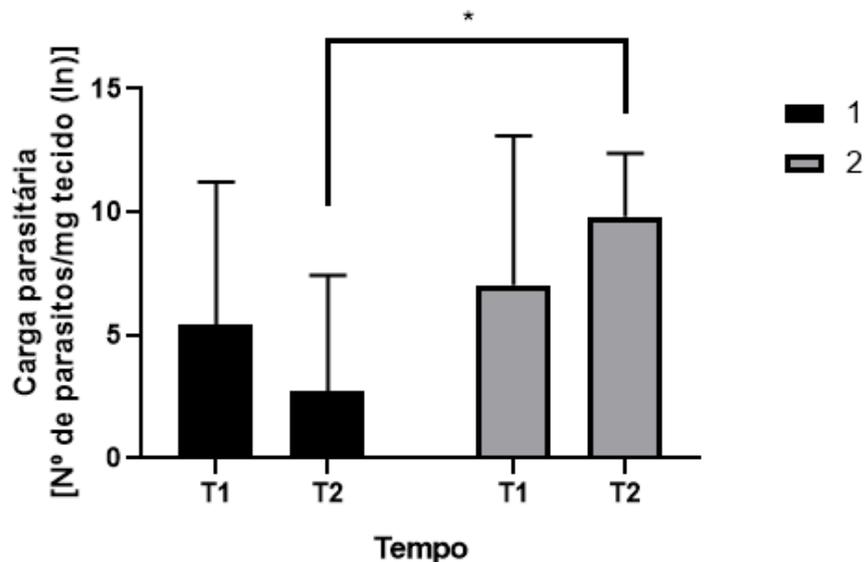
Para a comparação da média da carga parasitária, antes e após o tratamento com Milteforan®, de dois grupos relacionados (T0 e T1), foi utilizado o teste estatístico de Wilcoxon. Utilizando um “n” amostral de 24 cães, o resultado do teste de Wilcoxon (teste de Wilcoxon=0, $p < 0,05$) indicou redução significativa da carga parasitária após o tratamento (T1) com o medicamento Milteforan® (Figura 14). Esse resultado reforça que o medicamento Milteforan® apresentou eficácia na diminuição da carga parasitária dos cães analisados.

Figura 14 - Comparação das cargas parasitárias médias da pele de cães com leishmaniose visceral (n=24) obtida por qPCR antes (T0) e após 31 dias após a primeira dose do tratamento (T1) com Milteforan® através do Teste de Wilcoxon $W=0$, * $p<0,05$.



Para a análise da associação entre carga parasitária e diferentes esquemas terapêuticos utilizados para o tratamento dos cães, os dados foram organizados em dois grupos (1 e 2). O grupo nomeado como esquema terapêutico 1, incluiu os 15 cães tratados com Milteforan®, alopurinol e domperidona, foi comparado para os tempos T1 e T2 com o grupo nomeado de esquema terapêutico 2, que incluiu 9 cães com outros esquemas terapêuticos sem essa combinação. Os resultados mostram que no tempo T2 houve diferença significativa na carga parasitária entre os cães com esquema terapêutico 1 e os que realizaram esquema terapêutico 2 evidenciando que a carga parasitária nos cães que foram submetidos ao esquema terapêutico 2 foi mais alta ($p=0,0226$) (Figura 15).

Figura 15 - Comparação entre os esquemas terapêuticos empregados no tratamento e a carga parasitária dos cães com leishmaniose visceral.



T0 = antes do tratamento; T1 = 31 dias após a primeira dose do tratamento; T2 = 6 meses após o fim do tratamento. Análises estatísticas foram realizadas com um “n” amostral de 11 cães utilizando teste T não pareado $*p < 0,05$. 1= esquema terapêutico 1 (Milteforan® + alopurinol + domperidona), 2= esquema terapêutico 2 (cães que utilizaram apenas o Milteforan®, Milteforan®+alopurinol ou Milteforan®+imunoterapia).

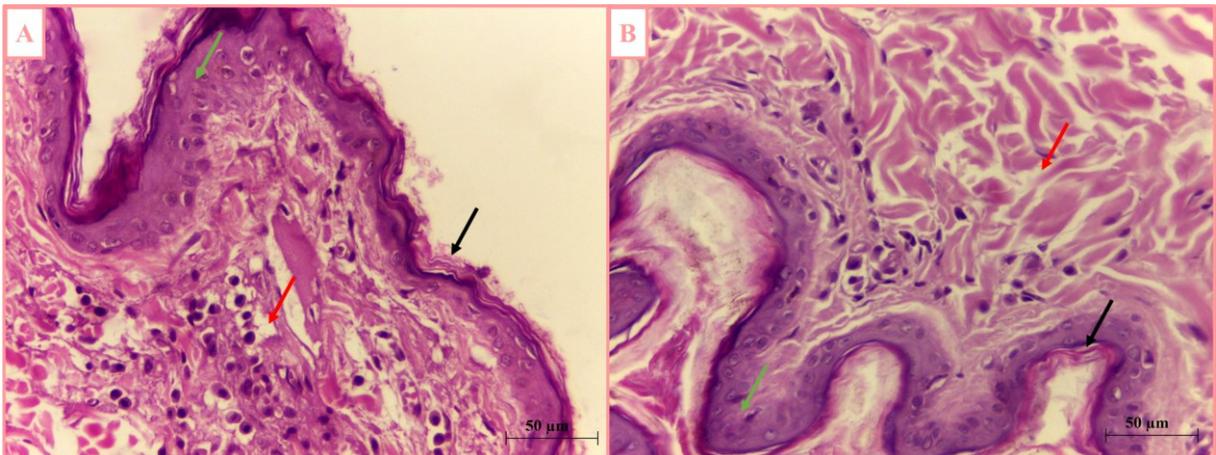
4.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A análise histomorfológica sistemática das amostras de pele íntegra dos animais nos diferentes tempos antes e após o tratamento permitiu determinar o padrão histológico da resposta inflamatória tecidual (intensidade e perfil celular) e a presença de amastigotas de *L. infantum* intrateciduals.

A maioria dos animais (20,83%) avaliados antes do tratamento (T0) apresentou dermatite superficial e perianexial linfoplasmohistiocítica multifocal leve a moderada, 16,67% dermatite superficial linfoplasmohistiocítica multifocal leve, 12,50% dermatite superficial plasmohistiocítica multifocal leve, 12,50% dermatite superficial linfoplasmohistiocítica difusa moderada, 8,33% dermatite superficial linfoplasmohistiocítica multifocal leve a moderada, 4,17% dermatite superficial linfoplasmohistiocítica focal leve e 4,17% dermatite superficial linfohistiocítica multifocal leve, sendo que 20,83% dos cães analisados no T0 não apresentaram dermatite. No T1 a maior parte dos animais (29%) apresentou dermatite superficial linfoplasmohistiocítica multifocal leve, 10% dermatite superficial histiocítica multifocal leve, 5% dermatite superficial e perianexial linfoplasmohistiocítica difusa leve a moderada, 5%

dermatite superficial e perianexial linfoplasmohistiocítica multifocal discreta, 5% dermatite superficial linfoplasmohistiocítica difusa moderada, 5% dermatite superficial linfoplasmohistiocítica multifocal leve a moderada, 5% dermatite superficial e profunda linfoplasmohistiocítica difusa moderada, 5% linfoplasmohistiocítica e neutrofílica multifocal leve, sendo que 33% dos cães analisados no T1 não apresentaram dermatite. No T2, apenas 8 cães foram analisados, sendo que 50% dos cães apresentaram dermatite superficial linfoplasmohistiocítica multifocal leve, 13% dermatite superficial linfoplasmohistiocítica difusa leve, 13% dermatite superficial perianexial linfoplasmohistiocítica multifocal discreta, sendo que 25% dos cães analisados no T2 não apresentaram dermatite. A figura 16 mostra o padrão inflamatório na pele de um cão com LVC antes do tratamento (T0) e 31 dias após a primeira dose do tratamento (T1), no qual é possível observar a redução na intensidade do infiltrado inflamatório, bem como a presença da hiperqueratose e da acantose antes (T0) e após o tratamento (T1).

Figura 16 - Perfil do infiltrado inflamatório na pele do cão número 3, antes e após tratamento com Milteforan®.

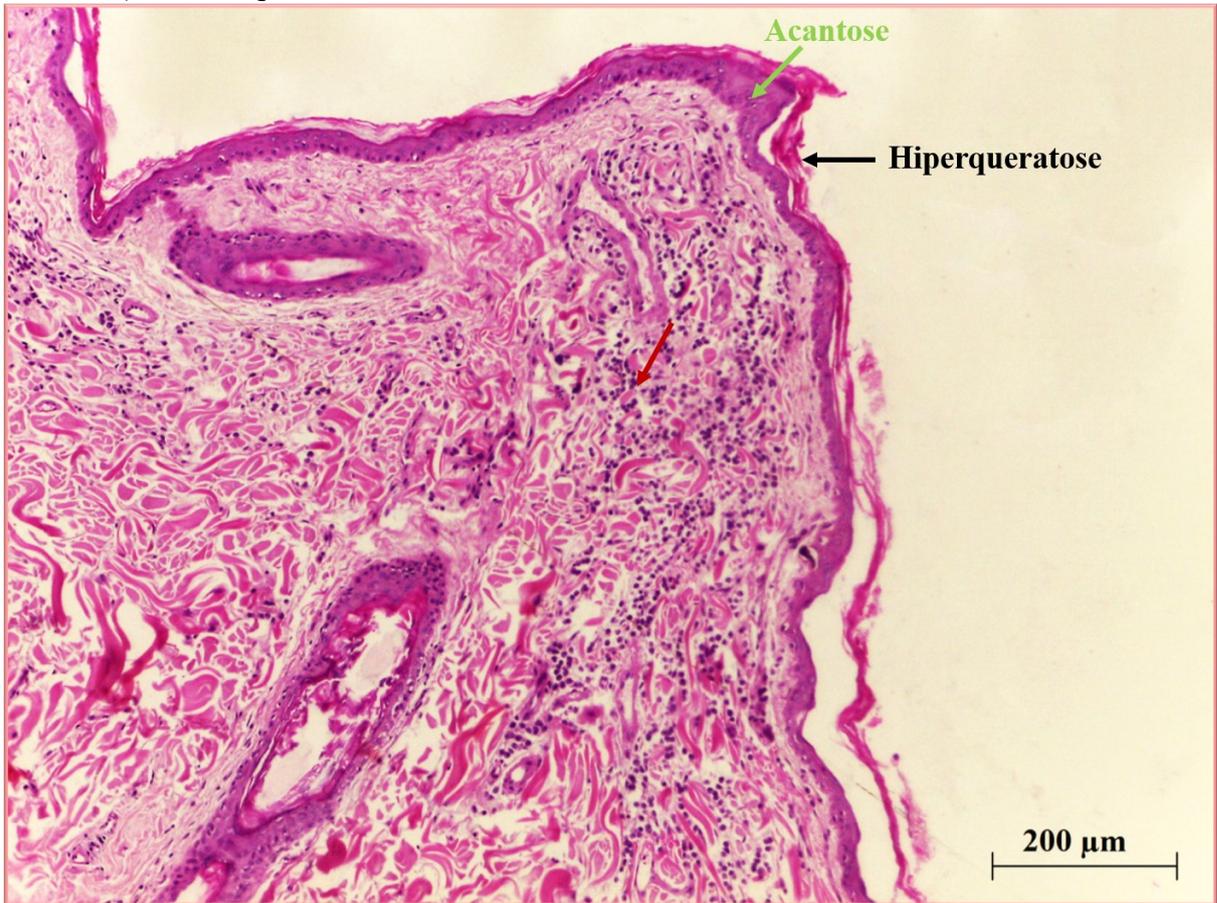


Perfil de infiltrado inflamatório (seta vermelha), hiperqueratose (seta preta) e acantose (seta verde) no T0 (antes do tratamento) (A) e perfil de infiltrado inflamatório (seta vermelha), hiperqueratose (seta preta) e acantose (seta verde) no T1 (31 dias após a primeira dose do tratamento) (B).

Fonte: Autora (2021).

A hiperqueratose é o espessamento da parte mais externa da epiderme (*stratum corneum*) e foi encontrada em 50% (n=24) dos animais avaliados. A acantose é o espessamento da camada espinhosa da epiderme e foi encontrada em 45% (n=24) dos animais avaliados. No T1, 50% (n=24) dos cães apresentaram hiperqueratose ortoqueratótica e 37,5% acantose (Figura 17). No T2 12,5% dos animais analisados (n=8) apresentaram hiperqueratose ortoqueratótica e 25% acantose.

Figura 17 - Análise histomorfológica de tecido cutâneo revelando dermatite superficial e profunda linfoplasmohistiocítica difusa moderada em cão com leishmaniose visceral (cão número 4) 31 dias após o início do tratamento com Milteforan®.



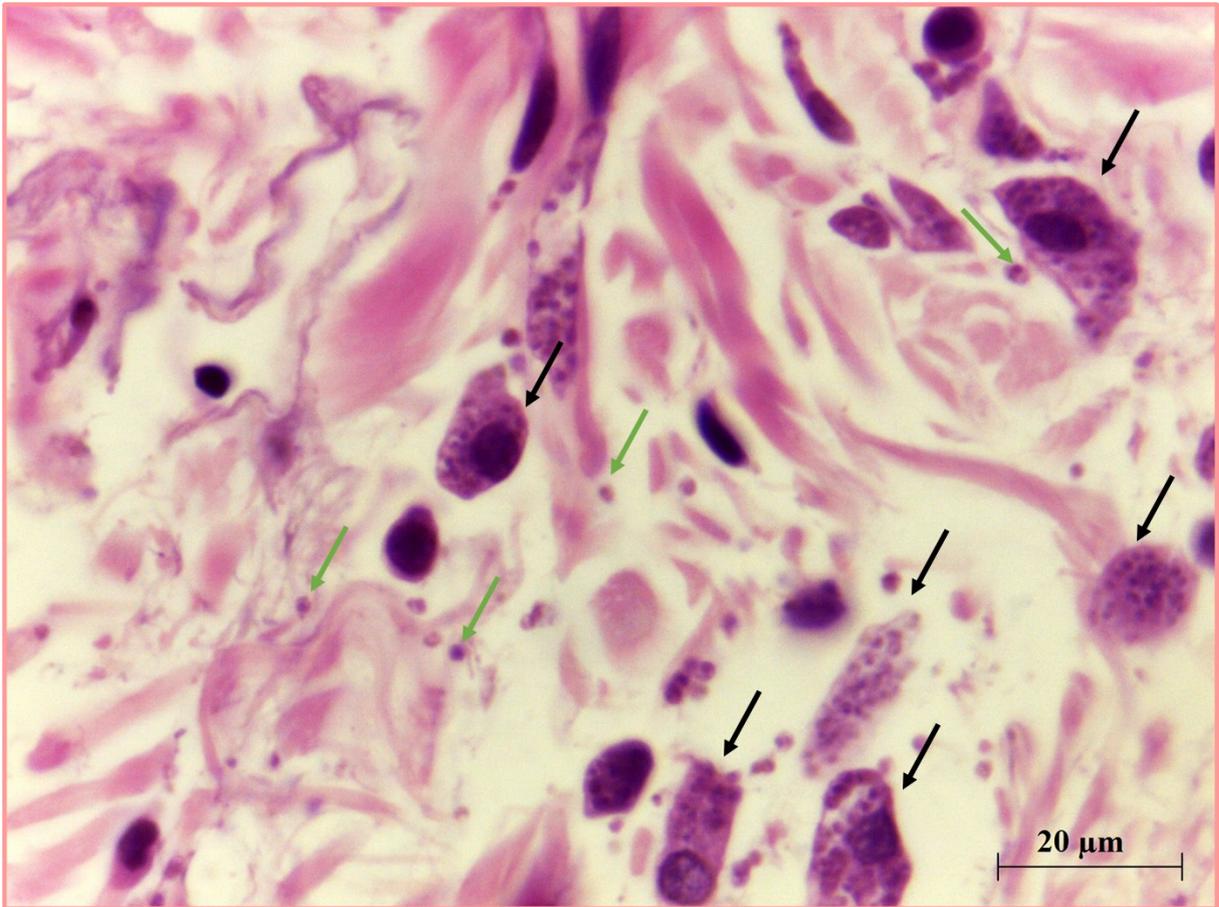
Hiperqueratose ortoqueratótica e acantose leves na pele na pele do cão de número 4 no tempo um (31 dias após a primeira dose do tratamento com Milteforan®). Seta vermelha indicando infiltrado inflamatório linfoplasmohistiocítico.

Fonte: Autora (2021).

Foi realizada a avaliação do padrão da resposta inflamatória em pele íntegra dos cães através da contagem de leucócitos em 10 campos em objetiva de 40x em microscópio óptico. No T0 (n=24) as amostras de pele dos cães analisados apresentaram uma média de 25,58 leucócitos em 10 campos. No T1 (n=24), a média leucocitária foi de 19,45 leucócitos e no T2 (n=8) a média leucocitária foi de 13,62.

Além disso, foi analisada a porcentagem de fragmentos de pele de cães com a presença de macrófagos contendo amastigotas de *L. infantum* em 10 campos (Figura 18). No T0 (n=24) 33,33% das amostras continham células infectadas, no T1 (n=24) 15% e no T2 foi zero. O número médio de macrófagos com amastigotas de *L. infantum* no T0 foi de 2,62 no T1 foi de 0,6 e no T2 foi zero.

Figura 18 - Presença de macrófagos contendo formas amastigotas de *L. infantum* na pele do cão com leishmaniose visceral de número 3 antes do tratamento.



Macrófagos contendo formas amastigotas de *L. infantum* (setas pretas) e amastigotas livres (setas verdes).
Fonte: Autora (2021).

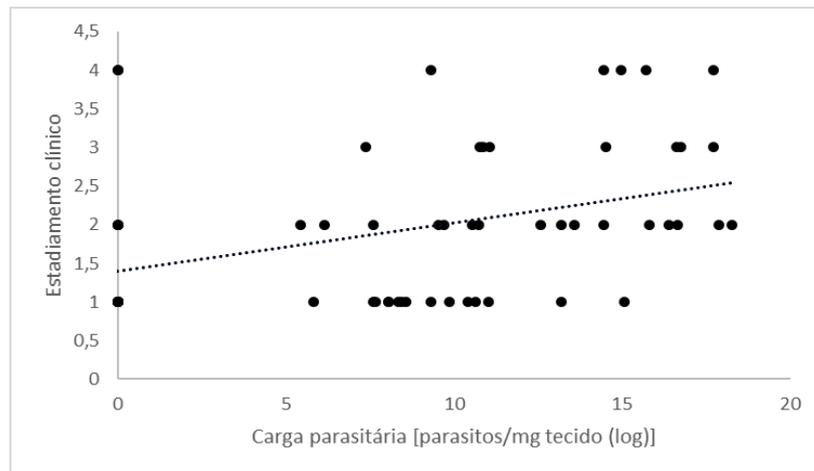
Análises de regressão linear realizadas para avaliar se a carga parasitária encontrada na pele de todos os cães estudados influenciou na variação do peso, nível de estadiamento, média leucocitária e presença de macrófagos contendo amastigotas de *Leishmania* spp. demonstraram que houve uma correlação positiva entre a carga parasitária e o nível de estadiamento, a quantidade de macrófagos contendo amastigotas de *L. infantum*, e a média leucocitária. No entanto, não houve correlação significativa da carga parasitária quando comparado com a variação de peso dos animais (Figura 19).

Figura 19 - Correlação da carga parasitária de cães com leishmaniose visceral antes do tratamento com Milteforan® através de regressão linear com as variáveis de peso, estadiamento clínico, média leucocitária e presença de macrófagos contendo amastigotas de *Leishmania* spp.

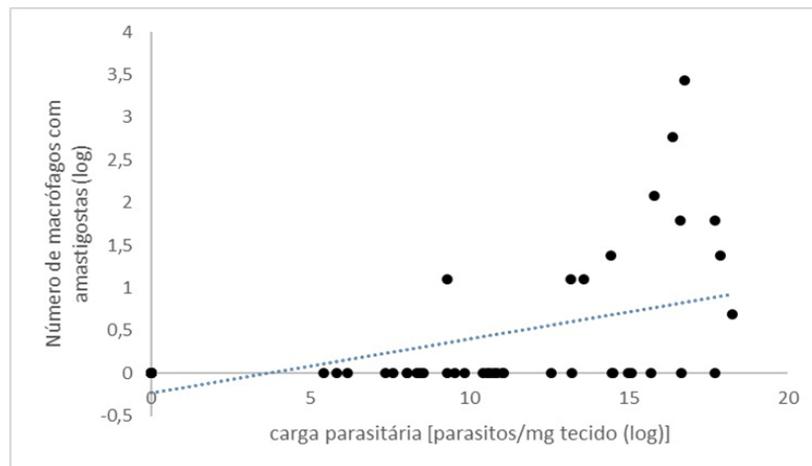
A)

Variável	Equação da reta	Valor de p	Correlação	R^2	É influenciada?
Peso	$Y = -0,026X + 21,15$	0,90	0,01	0,00	Não
Estadiamento	$Y = 0,06*X + 1,4$	0,003	0,37	0,13	Sim
Média leucocitária	$Y = 0,137*X + 6,55$	0,001	0,43	0,18	Sim
Macrófagos	$Y = 0,064*X - 0,2354$	0,000	0,49	0,25	Sim

B)



C)



D)

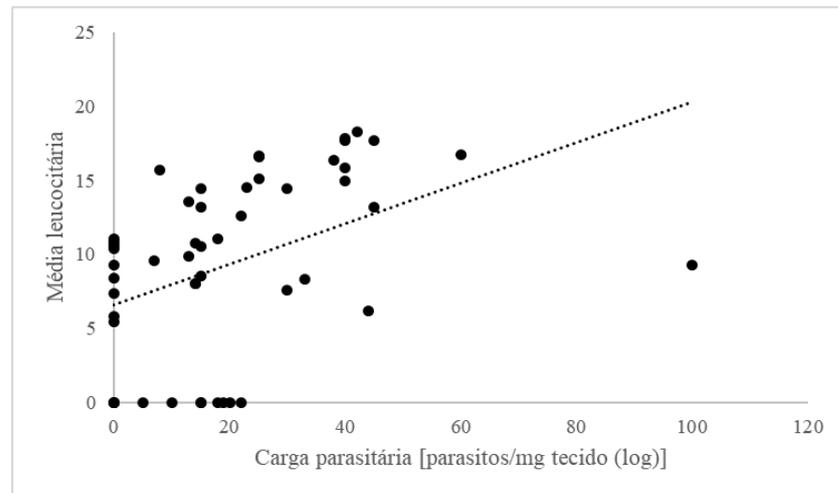


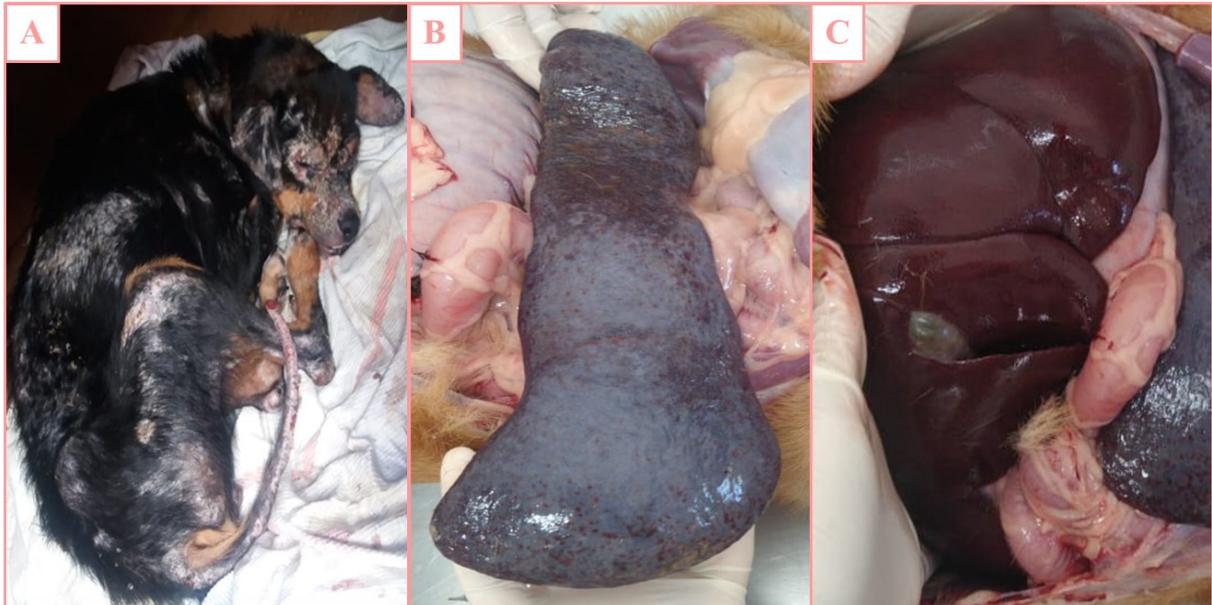
Tabela contendo as análises estatísticas de correlação entre a carga parasitária e as variáveis peso, estadiamento clínico, média leucocitária e presença de macrófagos contendo amastigotas de *Leishmania* spp. (A). Correlação entre a carga parasitária e estadiamento clínico dos cães (B). Correlação entre a carga parasitária e a quantidade de macrófagos com amastigotas na pele dos cães (C). Correlação entre a carga parasitária e média leucocitária em cães (D).

4.5 VALIDAÇÃO DA AMOSTRA DE LINFONODO PARA DETECÇÃO E ISOLAMENTO DO PARASITO.

Além dos cães acompanhados durante o tratamento, no presente trabalho também foram obtidas amostras de cães com LVC submetidos a eutanásia no CCZ do Município de Florianópolis-SC. Os dados destas amostras foram somados a dados de amostras processadas no laboratório de Protozoologia desde 2014, totalizando informações de 75 animais eutanasiados. Destes cães, 50,66 % dos cães eram fêmeas e 49,33% dos cães eram machos. Em relação a raça, 76% dos animais eram sem raça definida e os outros 24% das seguintes raças: três pastores alemães, um *beagle*, um *basset hound*, dois *pinschers*, três labradores, um fila, um *pug*, um pastor canadense, três *rottweilers*, um *hasa apso*, um pastor australiano, um *poodle* e um *pitbull*.

Esses cães apresentavam sinais clínicos e anatomopatológicos clássicos da doença, como hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia, lesões de pele principalmente ao redor de orelhas, olhos, focinhos e rabo, onicogribose, apatia, perda de peso, perda de massa muscular, alopecia generalizada, conjuntivite como exemplificado pelas imagens do cão (Figura 20).

Figura 20 - Sinais clínicos de um cão com leishmaniose visceral destinado à eutanásia no CCZ de Florianópolis.



Cão com alopecia generalizada, dermatite esfoliativa, caquexia, lesão na ponta da orelha e ponta do rabo, blefarite, conjuntivite (A), esplenomegalia (B) e hepatomegalia (C).

Fonte: Autora (2021).

Durante a necropsia dos animais, amostras biológicas de medula óssea, linfonodo, baço e fígado foram coletadas e utilizadas na tentativa de isolamento do parasito em cultura. As amostras de medula, baço e linfonodo foram as amostras biológicas com mais sucesso no isolamento do parasito com 81%, 80% e 76% respectivamente (Tabela 5). Considerando que o linfonodo é o tecido de coleta mais facilitada por ser menos invasivo para o animal comparado com as amostras biológicas de medula e baço, esse estudo enfatiza a utilização de linfonodo como a amostra biológica mais indicada para o diagnóstico da LVC e isolamento do parasito em cultura.

Tabela 5 - Dados gerais dos cães com diagnóstico de leishmaniose visceral que foram eutanasiados pelo CCZ de Florianópolis e tiveram a necropsia realizada pelo Laboratório de Protozoologia da UFSC. Os tecidos coletados foram utilizados para a tentativa do isolamento em cultura do parasito.

Sexo	Raça	Localidade	Cultura / Positividade			
			Medula	Linfonodo	Baço	Fígado
F	SRD	Itacorubi	Sim	Não	Não	Sim
M	SRD	Saco Grande	Sim	Sim	Sim	Sim
M	Pinscher	Itacorubi	Sim	Sim	Sim	Sim

F	SRD	Lagoa da Conceição	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Lagoa da Conceição	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Canto da Lagoa	Sim	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Canto da Lagoa	Sim	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Canto da Lagoa	Sim	Sim	Sim	Sim
M	Pastor Canadense	Jurerê	Sim	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Saco Grande	Sim	Sim	Sim	Sim
F	Fila	Canto dos Araças	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Costa da Lagoa	Sim	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Lagoa da Conceição	Sim	Sim	Sim	Sim
F	Rottweiler	Lagoa da Conceição	Sim	Sim	Não	Sim
M	SRD	Lagoa da Conceição	Sim	Sim	Sim	Sim
M	Labrador	Lagoa da Conceição	Sim	Sim	Sim	Sim
F	Labrador	Canto da Lagoa	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Rio Tavares	Sim	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Rio Tavares	Sim	Sim	Sim	Não
F	SRD	Rio Tavares	Sim	Sim	Não	Sim
M	Lhasa Apso	Canto da Lagoa	Sim	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Rio Tavares	Sim	Sim	Não	Sim
M	Pastor Alemão	Praia Mole	Sim	Sim	Sim	Sim
F	Pastor Australiano	Canto dos Araças	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Costa da Lagoa	Sim	Sim	Sim	Sim
F	Rotweiler	Lagoa da Conceição	Sim	Sim	Sim	Sim
F	Rotweiler	Lagoa da Conceição	Sim	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Lagoa da Conceição	Sim	Sim	Não	Sim
F	SRD	Córrego Grande	Sim	Sim	Não	Sim
F	SRD	Córrego Grande	Sim	Sim	Sim	Não
M	SRD	Córrego Grande	Sim	Sim	Sim	Não
M	Poodle	Saco Grande	Sim	Sim	Sim	Não
M	SRD	Campeche	Sim	Sim	Sim	Não
M	SRD	José Mendes	Sim	Sim	Sim	Sim

F	Pitbull	Itacorubi	Sim	Sim	Sim	Sim
M	Pastor Alemão	Canto da Lagoa	Sim	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Canto dos Araçás	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Campeche	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Costeira	Sim	Sim	Não	Não
F	SRD	Morro da Mariquinha	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	DIBEA/ histórico Quilombo	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Morro da Mariquinha	Sim	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Saco dos Limões/Cachoeira	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Agronômica	Sim	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Morro do Quilombo	Não	Não	Sim	Não
M	Beagle	Lagoa da Conceição	Não	Não	Sim	Não
M	SRD	Saco Grande	Não	Sim	Sim	Não
M	SRD	Rio Vermelho	Não	Não	Não	Não
F	SRD	Vargem do bom Jesus	Não	Sim	Não	Não
M	Mix basset	Ratones	Não	Não	Sim	Não
F	SRD	Saco dos limões	Sim	Não	Não	Não
F	SRD	Inglese	Não	Não	Não	Não
M	SRD	Pantanal	Sim	Não	Sim	Não
M	SRD	Saco dos limões	Sim	Não	Não	Não
F	SRD	Córrego Grande	Sim	Sim	Não	Não
F	SRD	Cacupé	Não	Sim	Sim	Não
F	Labrador	Costeira	Não	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Morro do Horário	Não	Não	Sim	Sim
M	Pug	Vargem do Bom Jesus	Sim	Não	Sim	Sim
M	SRD	Itacorubi- Inglese	Sim	Sim	Sim	Não
M	SRD	Campeche-Saco dos limões	Não	Não	Sim	Sim
F	SRD	Campeche	Sim	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Campeche	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Ratones	Sim	Não	Sim	Não
M	SRD	Canto da Lagoa	Sim	Não	Sim	Não

F	SRD	Costeira do Pirajubaé	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Canto da Lagoa	Não	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Monte Serrat	Sim	Não	Sim	Sim
M	SRD	Costeira	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	Agronômica	Sim	Sim	Sim	Sim
F	SRD	José Mendes	Sim	Sim	Sim	Sim
F	Pinscher	Agronômica	Sim	Não	Não	Sim
F	SRD	Saco Grande	Não	Sim	Sim	Sim
M	SRD	Saco dos Limões	Não	Não	Sim	Sim
M	SRD	Morro do Horário	Sim	Não	Não	Sim
Porcentagem			81%	76%	80%	72%

5. DISCUSSÃO

A LVC, uma das zoonoses mais importantes na atualidade, é uma doença parasitária de grande importância na medicina veterinária, considerando o elevado número de cães infectados e o grande impacto em Saúde Pública. Nos últimos anos, sua dispersão geográfica vem aumentando consideravelmente, assim como, o número de casos de LVC no Brasil e em Santa Catarina. Sabendo que o papel do cão no contexto epidemiológico da LV é de extrema relevância, principalmente em áreas urbanas, o município de Florianópolis, SC é considerado uma área endêmica recente com 3,5% dos cães sororreagentes para LV (DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2020). Apesar de ser uma doença de notificação compulsória, em Florianópolis é sabido que poucos Médicos Veterinários notificam casos suspeitos ou confirmados ao órgão oficial (INDÁ, 2016), tornando assim, difícil saber a verdadeira prevalência da doença em cães no município.

No cenário epidemiológico, Florianópolis é uma ilha com áreas de mata somadas a grandes áreas de desmatamento e que possui um grande número de cães errantes, sendo que estes, são mais expostos à infecção do que aqueles domiciliados, provavelmente tendo uma maior participação na propagação da doença, pois podem migrar entre ambientes urbanos, periurbanos e rurais (AMARO, 2016; OLIVEIRA, 2003). Outro fator relevante no contexto da doença no município que difere da maior parte das localidades endêmicas para LV é a ausência do vetor clássico envolvido na transmissão do parasito. Até o momento, a espécie *Lu. longipalpis* não foi encontrada nos levantamentos da fauna flebotomínea realizada na região. No entanto, outras espécies foram relatadas com a presença de DNA de *Leishmania* em estudos anteriores, tais como: *Pi. fischeri*, *Mg. migonei* e *Ny. neivai* e, por isso, apontadas como suspeitas de serem os possíveis vetores de *L. infantum* no município de Florianópolis (CATECATI, 2018; DIAS et al., 2013; STEINDEL et al., 2013).

Os sinais clínicos da LVC são inespecíficos e variáveis, possivelmente devido a diferentes mecanismos associados a patogênese da doença e a diferentes padrões de resposta imune dos hospedeiros (SUDARSHAN; SUNDAR, 2014). No presente estudo foi evidenciada uma correlação positiva entre a carga parasitária de *Leishmania* e a presença de sinais clínicos em cães com LV, o que corrobora com outros estudos que descreveram que os principais sinais clínicos são causados devido ao intenso parasitismo e conseqüentemente a deposição de imunocomplexos frente a reação imunomediada desencadeada pelo parasito em diferentes locais (DIAS et al., 2021; MANZILLO et al., 2013; MANNA et al., 2009). Dentre os sinais

clínicos presentes nos animais infectados avaliados neste estudo, a linfadenopatia foi o mais presente, acometendo 83% dos cães corroborando com outros estudos que apontaram uma prevalência de 60 a 90% desse sinal clínico em cães com LVC (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008). A onicogribose foi o segundo sinal clínico mais observado neste estudo, acometendo 75% dos cães analisados, sendo o mesmo observado em estudo realizado por Verçosa e colaboradores (2008) em que a frequência de onicogribose foi de 83,3% em cães naturalmente infectados em uma área endêmica de Teresina, Piauí.

O estadiamento clínico na LVC é de grande importância tendo em vista o tratamento, acompanhamento e estabelecimento de prognóstico (BRASILEISH, 2018). Animais que apresentam estádios mais avançados da doença, possuem prognóstico ruim e podem vir a óbito (ROURA et al., 2013). A insuficiência renal é uma das causas mais comuns de morte em cães com LVC (PINEDA et al., 2017). Nesse estudo observamos que cães com estádios mais avançados não se restabelecem tão bem quando comparados aos cães em estádios iniciais, e diante dessas circunstâncias, três cães em estágio IV acompanhados neste projeto vieram a óbito. Segundo Roura e colaboradores (2013) e Miró e colaboradores (2011), quanto menor for o nível de estadiamento clínico da doença e mais cedo os animais infectados forem diagnosticados, melhor é o prognóstico e menor risco de dispersão da doença.

O diagnóstico da LVC representa um grande desafio, pois a doença se desenvolve com uma variedade de formas clínicas, desde infecção assintomática até uma doença generalizada grave. Além disso, a LVC pode acometer qualquer órgão, tecido ou fluido corporal do cão, apresentando sinais clínicos inespecíficos, muitas vezes referentes a outras doenças. Outra situação que contribui para disseminação da doença é o fato de que os hospedeiros podem permanecer assintomáticos durante longos períodos de tempo (ASLAN et al., 2016). Em relação aos métodos utilizados para o diagnóstico da LVC, os testes imunocromatográfico, tem como vantagens o rápido processamento das amostras e obtenção dos resultados; análise de um grande número de animais em um tempo reduzido; aplicação em inquéritos epidemiológicos; e o custo relativamente baixo, dispensando a estrutura laboratorial, além disso são acessíveis, de rápida execução e reprodutibilidade em campo (RIBEIRO et al., 2019), sendo rotineiramente utilizados para o diagnóstico da LVC, na qual campanhas epidemiológicas realizadas no Brasil utilizam o teste rápido DPP para triagem e o teste de ELISA como confirmatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). No entanto esses testes possuem uma menor sensibilidade na identificação do parasito, principalmente naqueles cães assintomáticos (GRIMALDI et al., 2012), devido principalmente ao fato desses animais poderem apresentar uma menor carga parasitária e baixos

níveis de anticorpos anti-*Leishmania* (CARVALHO, et al., 2018). Outro fato importante é a possibilidade de reação cruzada com outras espécies de protozoários, principalmente tripanosomatídeos, o que dificulta o diagnóstico correto do cão (FIGUEIREDO et al., 2018; GRIMALDI et al., 2012), podendo levar a resultados falso-positivos e, devido a isso, cães não infectados podem ser conduzidos à eutanásia, ou resultados falso-negativos, que resultam na manutenção de cães infectados no ambiente. No entanto, neste estudo relatamos que todos os animais oriundos dos inquéritos sorológicos, no qual foram realizados o teste rápido DPP pelo CCZ e ELISA como confirmatório pelo LACEN/SC, foi possível encontrar a presença do parasito em pelo menos um órgão na necropsia e nas biópsias dos cães tratados.

A utilização de métodos moleculares, como a técnica de PCR, apresenta uma maior confiabilidade como diagnóstico da infecção, independente das condições clínicas do animal (CARVALHO, et al., 2018). Segundo Sudarshan e Sundar (2014), a utilização da técnica de PCR permite o diagnóstico correto da infecção em cães, mesmo naqueles assintomáticos para a doença e/ou com carga parasitária baixa. Além disso, diferentes estudos também já comprovaram a maior eficácia da PCR para a detecção da infecção por *Leishmania*, quando comparado com testes sorológicos, devido a sua alta sensibilidade e especificidade (GALLUZZI et al., 2018; CARVALHO et al., 2018; LOPES et al., 2017; COSTA, et al., 2015). Portanto, com o avanço da biologia molecular como ferramenta no diagnóstico de cães infectados por *L. infantum*, a técnica de qPCR vem sendo utilizada para a quantificação da carga parasitária em diferentes tecidos de cães, com ou sem manifestações clínicas, tornando o resultado mais confiável pela sua alta sensibilidade e especificidade, podendo ser empregada tanto no diagnóstico quanto no monitoramento da infecção durante o tratamento (RIBEIRO, 2020; CARVALHO et al., 2018; REIS et al., 2013; ANDRADE et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2009; QUARESMA et al., 2009; FRANCINO et al., 2006). Apesar disso, a implementação da metodologia de qPCR para o diagnóstico da LVC ainda é uma realidade distante de muitos laboratórios centrais e de pesquisa envolvidos no monitoramento epidemiológico da doença, pois demanda elevados custos, estrutura física, equipamentos e reagentes específicos, além de recursos humanos treinados (LOPES et al., 2017; TRAVI, et al., 2018).

A técnica de qPCR dirigida ao kDNA de *Leishmania* foi escolhida no presente estudo porque este alvo apresenta como vantagem um maior número de cópias no genoma mitocondrial do parasito aumentando, significativamente, a sensibilidade das técnicas

moleculares na detecção e tipificação de *Leishmania* spp. nos diferentes tipos de tecidos (JARA et al., 2013; CHAGAS, 2019). Estudo realizado por Marcelino e Colaboradores 2020, relata que o melhor alvo para detecção *L. infantum* em cães naturalmente infectados foi a PCR dirigida ao kDNA de *Leishmania*, pois foi capaz de identificar 100% dos animais infectados. No presente estudo foi empregado nas qPCRs, o sistema de detecção BRYT Green®, composto de um intercalante de DNA, que se liga a dupla fita do DNA e que amplificam o sinal de detecção da técnica (Ct), sendo caracterizado por uma boa especificidade e sensibilidade, além de, apresentar menor custo quando comparado ao sistema de sondas TaqMan (CHAGAS, 2021; GALLUZZI et al., 2018). Dessa maneira, este estudo contribuiu para a validação da técnica de qPCR como uma importante ferramenta de diagnóstico e monitoramento de cães infectados por *L. infantum*, pois sua alta sensibilidade associada à alta especificidade permitiu a identificação de *L. infantum* e quantificação da carga parasitária, mesmo em amostras com valores muito discrepantes no número de parasitos por miligrama de tecido, permitindo quantificar amostras contendo desde 225 até 85.523.884 parasitos/mg de pele. Existem vários métodos moleculares para a identificação de espécies de *Leishmania*, a técnica de PCR convencional associada à RFLP da região do *ITS1* foi utilizada neste estudo para identificar a espécie de *Leishmania* nos fragmentos de pele antes do tratamento, onde ocorreu confirmação da espécie *L. infantum* em todas as amostras coletadas antes do tratamento, indicando não serem casos associados a outras espécies de *Leishmania*. O estudo realizado por Graça e colaboradores (2012), mostrou maior sensibilidade da região do *ITS1* comparado ao gene *hsp70* usando amostras de DNA de fragmentos de tecido coletados de cães com LVC (MARCELINO et al., 2020).

A eutanásia ainda é preconizada pelo Ministério da Saúde (MS) para o controle da LVC (BRASIL, 2016). Atualmente, a partir do momento em que o cão é diagnosticado com LVC, o tutor tem a opção de tratar, porém, ao contrário de outros países que podem utilizar uma maior diversidade de medicamentos leishmanicidas como os antimoniais pentavalentes (MANNA et al., 2015), o único fármaco leishmanicida autenticado e permitido pelo MAPA para tratamento de cães no Brasil é a miltefosina (Milteforan®) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2016). O tratamento tem sido apontado como uma alternativa à eutanásia, visto que a eutanásia vem sendo muito questionada como medida de controle eficaz da doença (DANTAS-TORRES et al., 2019; MELO et al., 2018).

O presente estudo propôs avaliar a carga parasitária no tecido cutâneo dos 24 cães soropositivos, tratados com o medicamento Milteforan® e associações terapêuticas, na região da grande Florianópolis/SC. Foi levado em consideração informações sobre o estado clínico

dos animais, carga parasitária nos diferentes tempos e as condições hematológicas e bioquímicas dos animais no tempo zero. Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que o tecido cutâneo mostrou uma correlação entre a quantidade de DNA de parasitos/mg de tecido e o escore clínico desses animais, sendo que animais mais sintomáticos apresentaram maior carga parasitária, resultados estes semelhantes aos observados por Chagas e colaboradores (2021) e Pereira e colaboradores (2016).

Os resultados observados neste estudo, referentes à resposta do tratamento nos diferentes tempos demonstraram que houve diminuição na carga parasitária, bem como redução dos sinais clínicos dos animais na maioria dos animais, identificando-se apenas dois cães com aumento na carga parasitária na pele após 6 meses do tratamento, sendo dois em relação ao tempo (T1) e um cão em relação ao tempo (T0). Os resultados mostraram que o uso do Milteforan® contribui para a melhora clínica, diminui a carga parasitária que consequentemente sugere a redução da infectividade desses cães como reservatórios dos parasitos para os vetores (RIBEIRO, 2020). Esse resultado corrobora com os encontrados nos estudos realizados por Chagas e colaboradores (2021), Nogueira e colaboradores (2019) e Andrade e colaboradores (2011). Observamos também que a carga parasitária inicial dos cães não influenciou na resposta ao tratamento, sendo que cães com carga parasitária inicial alta, após o tratamento tiveram redução significativa da carga parasitária. Este estudo observou também que o uso dos medicamentos associados mostrou ser uma boa opção de tratamento quando comparado a uma terapia utilizando um único medicamento. Além disso, o uso das terapias combinadas (Miltteforan® + alopurinol + domperidona) manteve a carga parasitária dos cães mais baixas em relação aos cães que foram tratados com outros esquemas terapêuticos usando apenas um ou dois fármacos. Segundo Dias e colaboradores (2020), o tratamento da LVC demonstrou ser mais eficaz, quando combinou o uso dos medicamentos Milteforan® e alopurinol, comparado com cães apenas tratados com Milteforan®. Atualmente na rotina de tratamento da LVC não há uma uniformidade do tratamento em relação as os esquemas terapêuticos utilizados em associação com Milteforan®. Alguns Médicos Veterinários utilizam associações terapêuticas por períodos variáveis, fazendo com que não exista um protocolo único a ser seguido, sendo urgente o estabelecimento e uso de protocolos mais uniforme e mais eficazes.

Neste estudo foram selecionadas amostras biológicas de pele e linfonodo poplíteo para avaliação da carga parasitária e isolamento do parasito *L. infantum*, respectivamente. A utilização dessas amostras foi priorizada devido ao fato de as mesmas serem de fácil acesso e

causarem uma menor chance de infecção secundária nas condições de coletas em domicílio, além de que a manipulação menos invasiva dos animais aumenta a adesão dos tutores permitindo o acompanhamento prolongado dos animais. Diversos estudos vêm apontando que a pele e o linfonodo poplíteo são amostras biológicas promissoras para o diagnóstico da LVC, pois além de serem coletadas de formas menos invasivas, essas amostras possuem elevados níveis de parasitismo (CHAGAS et al., 2021; RAMOS et al., 2013). Além disso, Chagas (2021) observaram a correlação dos sinais clínicos com a carga parasitária de amostras de pele, linfonodo, medula e *swab* ocular e demonstraram que a pele da superfície interna da orelha foi o tecido que apresentou a maior quantidade de DNA de parasitos, seguido da amostra biológica de linfonodo.

O diagnóstico da LVC utilizando amostras de pele é tão eficiente quanto aqueles que utilizaram amostras de baço, medula óssea e linfonodo, independente da presença de lesões cutâneas (LOPES et al., 2020). Os fragmentos de pele íntegra podem ser utilizados em substituição aos demais tecidos, por se caracterizar como uma amostra de fácil obtenção (LOPES et al., 2020). Isso foi comprovado em nosso estudo também pelo fato de utilizarmos amostras de pele íntegra da região abdominal nos animais, ao invés de fragmentos de pele de orelha que é uma área comumente utilizada para diagnóstico pela presença de lesões cutâneas, porém, é uma região muito vascularizada, sendo mais invasiva e tornando difícil a coleta de três fragmentos, principalmente naqueles animais de pequeno porte. O tecido cutâneo do cão possui importância para a manutenção da doença no ciclo do parasito, no qual, estudos demonstraram a relação entre alta carga parasitária na pele com uma maior capacidade dos cães em infectar flebotomíneos (BORJA et al., 2016). Estes estudos reforçaram a importância do tecido cutâneo como marcador de infectividade para o flebotomíneo, especialmente em ambiente onde encontram-se cães com diferentes graus de parasitismo, como em centros urbanos (BORJA et al., 2016), confirmando assim o relevante papel do cão na manutenção do ciclo de transmissão da doença (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). Sendo assim, animais tratados, e, portanto, com menor carga parasitária possivelmente são menos infectantes aos flebotomíneos.

Outro resultado importante encontrado neste estudo foi que em 70% das amostras de linfonodo poplíteo coletados em cães com LVC antes do tratamento (T0) e 76% das amostras coletadas a partir de necropsia de cães com LVC, foi possível isolar o parasito, sendo que, o isolamento do parasito em meio de cultura é considerado o padrão ouro no diagnóstico de leishmaniose, pois além de confirmar o diagnóstico clínico da doença, ainda preserva o parasito

isolado, que pode ser utilizado em outros testes e estudos, como na identificação da espécie de *Leishmania* ou em estudos de variabilidade genética (DIAS, et al., 2021; CHAGAS, 2019). Muitos autores consideraram o linfonodo poplíteo uma amostra altamente sensível para detecção de *Leishmania* em cães infectados, além disso, a punção de linfonodo é uma técnica rápida e menos invasiva comparada a medula óssea (MARCELINO et al., 2020). Dessa forma, os resultados obtidos possibilitam a utilização da amostra biológica de aspirado de linfonodo poplíteo (uma técnica menos invasiva) em substituição a punção de medula, para o monitoramento e diagnóstico da infecção em cães, em vista da alta positividade e fácil obtenção e de que outros estudos comprovaram que amostras de medula óssea e linfonodo poplíteo não apresentam diferença significativa na quantidade de DNA de parasitos/ μ l (CHAGAS, 2019; RAMOS et al., 2013).

Em relação às características dos cães, 76% dos cães oriundos das necropsias e 67% dos cães oriundos do monitoramento do tratamento para LVC eram sem raça definida, essa ocorrência indica a possibilidade de que a maioria dos cães sem raça definida tinham acesso à rua, os quais são mais expostos à infecção. Embora todas as raças de cães sejam susceptíveis à LVC, estudos sugeriram que cães sem raça definida possuem uma maior prevalência às infecções por *Leishmania* spp. (DORIA, 2020; MAIA et al., 2016).

Em estudos propostos por Cortes e colaboradores (2012) e Gálvez e colaboradores (2010), a prevalência de cães com LV, está diretamente relacionada aos hábitos de moradia de cada animal, no qual, o risco de exposição de cães ao flebotomíneo vetor da doença, está diretamente relacionado ao grau de exposição do animal ao ambiente externo. Diante disso, foi observado que cães que vivem exclusivamente em ambientes externos apresentaram três vezes mais incidência da doença em relação àqueles que vivem exclusivamente em ambientes internos (CORTES et al., 2012), essa condição, teve relação ao encontrado no presente estudo, em que 54% dos cães viviam no peridomicílio, 29% viviam no intradomicílio e 17% eram semidomiciliados.

O porte dos cães também parece ter relação com a incidência de LV. Em estudo proposto por Gálvez e colaboradores (2010), existiu uma prevalência até três vezes maior de LV em cães de porte grande, quando comparado com os animais de porte médio ou pequeno. Esses dados corroboram com os obtidos no presente estudo, no qual, 66% dos cães analisados possuem porte grande, 17% porte médio e 17% porte pequeno. Segundo Gálvez e colaboradores (2010), o porte está associado com uma maior exposição ao flebotomíneo, pois cães maiores tendem a

permanecer mais tempo na parte externa dos domicílios, além de associar a incidência de LVC, com uma maior área de contato do cão de porte grande ao inseto vetor.

Outro aspecto importante diz respeito à pelagem dos cães, que de acordo com as diferentes raças, podem apresentar pelagem curta, média ou longa, desempenhando um papel importante na taxa de frequência de LVC (CORTES et al., 2012). Esse fator teve relação ao encontrado neste trabalho, em que, dentre os cães com LVC monitorados, 58% dos cães tinham pelo curto, 29% tinham pelo médio, 13% tinham pelo longo. Estudos têm apontado que animais de pelo curto possuem uma maior propensão de contrair a infecção, já que a menor pelagem permite uma maior facilidade de acesso dos flebotomíneos ao local da picada, enquanto o pelo comprido dificulta o acesso do vetor a pele (GONÇALVES, 2014; CORTES et al., 2012).

Em relação à faixa etária dos animais, 52% dos cães com LVC acompanhados no presente estudo encontravam-se na faixa de idade entre zero a quatro anos, corroborando com estudos propostos por Gomes e colaboradores (2017) e Lopes e colaboradores (2014) que evidenciaram uma maior prevalência de cães com LVC, em cães com idade entre dois a quatro anos. Além disso, 66% dos cães diagnosticados com LVC e tratados no presente estudo são cães machos, fortalecendo evidências da literatura que relataram uma maior prevalência de LVC em cães do sexo masculino (DORIA, 2020; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

No presente estudo a avaliação histomorfológica e ensaios moleculares (qPCR) foram realizados em amostras de pele aparentemente íntegras, sem ulceração, provenientes da região abdominal de todos os animais, por ser uma área com menor quantidade de pelos e com facilidade aos flebotomíneos. Nossos resultados corroboram com dados da literatura, os quais descreveram que, mesmo em animais assintomáticos e em pele clinicamente sadia, podemos encontrar a presença de *L. infantum* (SOLANO-GALLEGO et al., 2004).

O padrão histológico na pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, está diretamente relacionado à área endêmica em que o animal habita, devido possivelmente às características genéticas distintas entre as cepas de *L. infantum* que circulam nas distintas regiões do Brasil (CARDOSO et al., 2013). A densidade parasitária tem sido associada a um padrão inflamatório em cães (CALABRESE et al., 2009). A quantificação do processo inflamatório na pele de cães com diferentes intensidades de parasitismo, está associada a um maior número de células inflamatórias em cães com média e alta carga parasitária (CARDOSO et al., 2013; VERÇOSA et al., 2008). Em relação à composição do infiltrado inflamatório presente na pele, este estudo descreve que o padrão inflamatório observado nos cães avaliados

era composto por células mononucleares com predomínio de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (histiócitos), respectivamente, presentes na derme superficial. Esses dados corroboram com a literatura que mostram a presença de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas na pele de cães com LV (ORDEIX et al., 2017; ROSSI et al., 2016; FIGUEIREDO et al., 2010). Foi observado infiltrado inflamatório na pele de 19 cães (79%) avaliados no tempo zero (T0), sendo padrão de resposta linfoplasmohistiocítica em 62,50% dos casos, corroborando com estudos realizados por Santos (2019) e Barros (2011).

O uso adequado de um método baseado em histologia para detecção de *Leishmania* na pele pode melhorar significativamente o conhecimento patogênese da LVC e seu potencial para infecção (TAFURI et al., 2004). Calabrese e colaboradores (2009) relataram que formas amastigotas de *L. infantum* foram frequentemente visualizadas livres no tecido conjuntivo dérmico, sendo que em nosso estudo, durante a avaliação histológica, foram detectadas formas amastigotas de *L. infantum* em fragmentos de pele em 33% dos animais no T0. Barros (2011) também encontrou formas amastigotas de *L. infantum* na pele de 42% dos animais e Rossi e colaboradores (2016) também observaram formas amastigotas de *L. infantum* em 46% dos animais sintomáticos e 36% dos animais assintomáticos.

Nossos resultados corroboram com estudos anteriores os quais mostraram que alterações epiteliais como hiperqueratose e acantose, têm sido descritas na LVC e são observadas tanto na pele aparentemente normal quanto na pele com lesões macroscópicas (SANTOS, 2019; BARROS, 2011).

Diante dessas circunstâncias, as informações obtidas com o desenvolvimento deste projeto vêm trazendo impacto no âmbito científico, social e em saúde pública no que diz respeito às medidas de vigilância e controle da transmissão da LV no Brasil e em Santa Catarina. Dessa forma, os resultados obtidos a partir deste estudo contribuem para validar a amostra biológica de pele íntegra, como a amostra padrão ouro para avaliar a carga parasitária em cães portadores de LV, sendo atualmente aceita esta amostra biológica em função do presente estudo pelo Centro de Controle de Zoonoses de Florianópolis para o monitoramento de cães com leishmaniose visceral.

6. RESUMO DOS RESULTADOS

- O Milteforan® foi capaz de induzir uma melhora dos sinais clínicos, com manutenção ou melhora no estadiamento clínico, sugerindo efetividade no tratamento de cães com LVC, mesmo não havendo cura parasitológica total;
- As amostras de biópsia aspirativa de linfonodo poplíteo foram eficientes para o isolamento de *L. infantum*, sendo possível o isolamento do parasito em 70% das amostras antes do tratamento com Milteforan®;
- Para todos os cães avaliados neste trabalho foi confirmada a infecção exclusiva pela espécie *L. infantum* por PCR-RFLP;
- O tecido cutâneo se mostrou eficiente para o diagnóstico e monitoramento da infecção por *L. infantum* em animais sem manifestações clínicas ou com diferentes graus de severidade da doença, sendo observada diminuição da carga parasitária na pele de cães após o tratamento com o Milteforan®;
- A técnica de qPCR dirigida ao kDNA de *Leishmania* spp. mostrou-se uma importante ferramenta de diagnóstico e monitoramento de cães infectados por *L. infantum*;
- A carga parasitária na pele de cães antes e após o tratamento com Milteforan® apresentou uma correlação positiva com a intensidade de sinais clínicos, média leucocitária e presença de macrófagos contendo amastigostas de *Leishmania* spp. em cães com LV;
- A associação do Milteforan® com alopurinol e domperidona se mostrou até o presente momento a combinação mais eficiente na manutenção da baixa carga parasitária dos animais após seis meses de tratamento com o Milteforan®;
- As amostras de biópsia aspirativa de linfonodo poplíteo foram adequadas para a detecção e isolamento de *L. infantum*, tornando essa amostra clínica indicada para o diagnóstico do parasito por ser de coleta facilitada e menos invasiva para o animal.

7. CONCLUSÃO

O tratamento dos cães com LVC da região da grande Florianópolis utilizando o Milteforan® foi eficiente, sendo observada melhora no estadiamento clínico, diminuição da carga parasitária e diminuição no processo inflamatório da pele até seis meses de acompanhamento pós tratamento. As amostras de pele e de linfonodo foram validadas no diagnóstico de *L. infantum*, estabelecendo-se um protocolo menos invasivo, seguro e eficiente para o acompanhamento da infecção pelos Médicos Veterinários, tutores e órgãos responsáveis.

REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. 3, 2016.
- ALEIXO, J. A. et al. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 1, p. 79-82, 2006.
- ALENCAR, J. E.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral. Em: Doenças Infecciosas e Parasitárias. **Guanabara Koogan**, p. 717, 1991.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, 2004.
- ALVAR, J., et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVES, E. B. et al. Effectiveness of insecticide-impregnated collars for the control of canine visceral leishmaniasis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 182, 2020.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- AMARO, A. Y. G. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral Humana e da Infecção Canina na zona urbana de Araguaína – TO, 2007 a 2014. Dissertação de mestrado em Saúde Coletiva, **Universidade Federal da Bahia**, 2016.
- 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.
- ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, p. 281-289, 2018.
- ASLAN, H. et al. New Insights Into the Transmissibility of *Leishmania infantum* From Dogs to Sand Flies: Experimental Vector-Transmission Reveals Persistent Parasite Depots at Bite Sites. **Journal Of Infectious Diseases**, v. 213, n. 11, p. 1752-1761, 2016.

ASSIS, T. M. et al. Cost-effectiveness of a canine visceral leishmaniasis control program in Brazil based on insecticide-impregnated collars. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

BANETH, G; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 315-314, 2002.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24 n. 7, p. 324-330, 2008.

BARROS, R. M. Caracterização histopatológica da leishmaniose visceral canina no distrito federal. Dissertação de mestrado em Saúde Animal, **Universidade de Brasília**, 2011.

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

BRASIL. Guia de vigilância em saúde. **Ministério da Saúde**, v. 1, 2016.

BRASIL. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. **Ministério da Saúde**. v. 1, 2017.

BRASILEISH. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina, p. 16, 2018. Disponível em: <<https://www.brasileish.com.br/revistadiretriz.html>>, acessado em 24/10/2021.

BRUNO, B. et al. Serum indirect immunofluorescence assay and real time PCR results in dogs affected by *Leishmania infantum*: evaluation before and after treatment at different clinical stages. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 31, p. 222–227, 2019.

BULTÉ, D. et al. Miltefosine enhances infectivity of a miltefosine-resistant *Leishmania infantum* strain by attenuating its innate immune recognition. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1-27, 2021.

CALABRESE, K. S. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 253-257, 2009.

CARDOSO, J. M. O. Implicações da evolução clínica e da carga parasitária em aspectos histopatológicos da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas, **Universidade Federal de Ouro Preto**, 2013.

CARDOSO, L. et al. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). **Acta Tropica**, v. 91, n. 2, p. 95-100, 2004.

CARNIELLI, J. B. T. et al. Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 789-794, 2019.

CARVALHO, F. L. N. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiology & Infection**. v. 146, n. 5, p. 571-576, 2018.

CATECATI, T. Leishmaniose visceral em Florianópolis: caracterização molecular das cepas de *Leishmania infantum* isoladas de casos locais e pesquisa vetorial. Dissertação de mestrado em Biotecnologia e Biociências, **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2018.

CAVALCANTI, M. P. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 356-358, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Leishmaniasis. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>, acessado em: 30/01/2021.

CHAGAS, E. et al. Leishmaniose Visceral Americana (Nova entidade mórbida do homem na América do Sul): relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, 1937.

CHAGAS, U. M. R. Avaliação da carga parasitária em cães, naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, para o aprimoramento do diagnóstico molecular e monitoramento da infecção. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde, **Instituto René Rachou**, 2019.

CHAGAS, U. M. R. et al. Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 291, 2021.

COELHO, A. C. et al. Multiple Mutations in Heterogeneous Miltefosine-Resistant *Leishmania major* Population as Determined by Whole Genome Sequencing. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

COIRO, C. J; SILVA, R. C.; LANGONI, H. Utilização do kDNA PCR no diagnóstico molecular de leishmanioses. **Ars Veterinária**, v. 29, n. 4, 2013.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). Leishmaniose visceral guia de bolso. **Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária**, v.1, 2020

CORTES, S. et al. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 189-196, 2012.

COSTA, L. N. G., et al. Evaluation of PCR in the diagnosis of canine leishmaniasis in two different epidemiological regions: Campinas (SP) and Teresina (PI), Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 143, p. 1088-1095, 2015.

COSTA, P. L. Comportamento da fauna de flebotomíneos, com ênfase em *Lutzomyia longipalpis*, em área endêmica para leishmaniose visceral no município de Passira, agreste de Pernambuco. Dissertação de mestrado acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, **Fundação Oswaldo Cruz**, 2011.

CROFT, S. L; SNOWDON, D, YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 38, 1996.

DAGA, M. K; ROHATGI, I; MISHRA, R. Leishmaniasis. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 25, n. 2, p. 166-170, 2021.

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, n. 3, p. 151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends In Parasitology**, p. 531-538. 2012.

DANTAS-TORRES, F. et al. Controle da leishmaniose canina no contexto de uma saúde. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 12, p. 1-4, 2019.

DANTAS-TORRES, F. et al. Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. **International Journal of Parasitology**, v. 50, n. 3, p. 171–176, 2020.

DEANE, M. P.; DEANE, L. M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente infectadas pela *L. donovani*. **O Hospital**, v. 46, p. 651-653, 1954.

DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* a Mini-Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 463-469, 1994.

DIAS, A. F. L. R., et al. Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 217, 2020.

DIAS, A. F. L. R., et al. Molecular detection of visceral leishmaniasis in dogs from Barão de Melgaço, Pantanal region of Mato Grosso, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, 2021.

DIAS, E. S. et al. Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Vector Ecology**, v. 38, n. 1, p. 193-196, 2013.

DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Leishmaniose Visceral Canina: informações para a população. 2020. Disponível em: <<http://www.dive.sc.gov.br/index.php/d-a/item/leishmaniose-visceral>>. Acessado em: 10/03/22.

DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) - Leishmaniose visceral. 2022. Disponível em: <<http://tabnet.dive.sc.gov.br/>>, acessado em: 20/03/2022.

DORIA, D. A. N. A importância do cão (*Canis familiaris*) na epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Diamantina (Minas Gerais, Brasil). Dissertação de mestrado em Biologia Animal, **Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri**, 2020.

DOSTÁLOVÁ, A., VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites Vectors**, v. 5, p. 276, 2012.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FERREIRA, G. R. et al. Human competence to transmit *Leishmania infantum* to *Lutzomyia longipalpis* and the influence of human immunodeficiency virus infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 126–133, 2018.

FERREIRA, S. A. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 6, 2012.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **International Canine Leishmaniasis Forum**, p. 6-10, 1999.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Leishmaniose Visceral Canina: dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, p. 4–7, 2012.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 11, 2018.

FIGUEIREDO, M. M. et al. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 7, p. 877-887, 2010.

FRAGA, D. B. M. et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian

tropics: a 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 591-594, 2012.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 161-173, 2003.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214–221, 2006.

GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia: classificação de phlebotominae. Em: Flebotomíneos do Brasil. **Editora Fiocruz**, p. 23-52, 2003.

GALLUZZI, L., et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 273, p. 2–13, 2018.

GÁLVEZ, R. et al. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid Region (Central Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 169, 327-334, 2010.

GÁLVEZ, R. et al. Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: A case of knowing your enemy. **Research in Veterinary Science**, v. 121, p. 94–103, 2018.

GAVGANI, A. S. et al. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomized trial. **The Lancet**, v. 360, p. 374-379, 2002.

da Graça, G.C., et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 664–674, 2012.

GOOGLE. Mapa de Florianópolis. **Google maps**. 2022. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/@-27.6111033,-48.5429885,11z/data=!5m1!1e4>>, acessado em: 14/03/2022.

GOMES, A. M., et al. Vigilância sorológica da leishmaniose humana e canina no município de Farias Brito, Estado do Ceará, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 1, p. 63-68, 2017.

GÓMEZ-OCHOA, P. et al. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 259-263, 2009.

GONÇALVES, M. B. Prevalência, distribuição e identificação de prováveis fatores de risco para Leishmaniose Visceral canina em Camaçari - BA. Dissertação de mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, **Fundação Oswaldo Cruz**, 2014.

GONTIJO, B; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p.71-80, 2003.

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

GONZÁLEZ, U. et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 8, 2015.

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

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 229-243, 2001.

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

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, n. 3. p. 218-223, 2010.

INDÁ, F. M. C. Estudo epidemiológico de leishmaniose visceral na população canina em seis localidades do município de Florianópolis, Santa Catarina. Dissertação de mestrado em Biotecnologia e Biociências, **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2016.

JARA, M., et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 1826-1833, 2013.

KAYE, P; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KHALILI, G. et al. Immunotherapy with Imiquimod Increases the Efficacy of Glucantime Therapy of *Leishmania major* Infection. **Iranian Journal of Immunology**, v. 1, n. 8, p. 45-51, 2011.

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

LAINSON, R., SHAW, J. J., LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil: IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para State, Brazil. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 6, 1969.

LIMA, W. G. Leishmaniose Visceral Canina: estudo quantitativo e comparativo da expressão do receptor do complemento do tipo 3 (cr3 cd11b/cd18) com alguns aspectos histológicos e parasitológicos do baço, fígado e linfonodos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Tese de doutorado em Patologia Geral, **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2007.

LOBO, P. M., et al. Saúde Única: uma visão sistêmica. **Editores Alta Performance**, v. 1, p. 36-39, 2021.

LOPES, J. V., et al. Canine visceral leishmaniasis in area with recent *Leishmania* transmission: prevalence, diagnosis, and molecular identification of the infecting species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

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 & Infection**, v. 145, p. 2436–2444, 2017.

LOPES, E. G. et al. Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of *Leishmania* infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis, in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 146, n. 3, p. 401-406, 2018.

LOPES, P. M., et al. Seroprevalence and risk factors associated with visceral leishmaniasis in dogs in Jaciara, State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 791-795, 2014.

MACHADO, J. G.; HOFFMANN, J. L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 50-58, 2007.

MACHADO, M. G. S. P. Nanopartículas poliméricas de pentamidina, uma estratégia no tratamento da leishmaniose. Dissertação de mestrado em Tecnologia Farmacêutica, **Universidade do Porto**, 2018.

MAIA, C.; DANTAS-TORRES, F.; CAMPINO, L. Parasite Biology: The Reservoir Hosts. The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. **Springer**, p. 79-106, 2018.

MAIA, C., et al. Molecular detection of *Leishmania infantum*, filariae and *Wolbachia* spp. in dogs from southern Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 170, 2016.

MAIA-ELKHOURY, A.N., et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 2941–2947, 2008.

NICOLLE, C. J. H., COMTE C. Origine canine du kala-azar. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 1, p. 299–301, 1908.

MANNA, L., et al. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 76-78, 2009.

MANNA, L., et al. *Leishmania* DNA quantification by Real-time PCR in naturally infected dogs treated with Miltefosine. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**, p. 358–360. 2008.

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

MANZILLO, V. F., et al. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naive dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 5, 2013.

MARCELINO A. P. et al. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Acta Tropica**, 2020.

MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 14-21, 2006.

MELO, S. N., et al. Prevalence of visceral leishmaniasis in a population of free-roaming dogs as determined by multiple sampling efforts: A longitudinal study analyzing the effectiveness of euthanasia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 161, p. 19-24, 2018.

MENDONÇA, I. L. et al. *Leishmania infantum* in domestic cats from the municipality of Teresina, state of Piauí, Brazil. **Parasitology Open**, v. 3, p. 1-8, 2017a.

MENDONÇA I. L. et al. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, 2017b.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Nota técnica N° 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Visceral: recomendações clínicas para redução da mortalidade. **Departamento de Vigilância Epidemiológica**, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. v. 1, 2014.

MIRÓ, G. et al. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasites Vectors**, v. 4, n. 52, 2011.

MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in biology and medicine, **Biology and epidemiology**. Academic Press, v. 1, p. 121-176, 1987.

MORENO, J. et al. Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, p. 1-7, 2012.

MORTARINO, M. et al. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parassitologia**, v. 46, p. 163-167, 2004.

MULLER G. C, et al. Proteção interna contra picadas de mosquito e mosca da areia: uma comparação entre velas de citronela, linalol e geraniol. **Journal of American Mosquito Control Association**, v. 24, p. 150-153, 2008.

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

NEVES, D. P. Parasitologia humana. n. 13. p. 41-47; 69-90; 399-409. **Atheneu**, 2016.

NOGUEIRA, F. S. et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 79, n. 12, p.1-11, 2019.

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

OLIVA, G. et al. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, p. 1192-1198, 2010.

OLIVEIRA, L. C. P. Soroprevalência da leishmaniose visceral canina no município de Dias D'Ávila, Bahia. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária Tropical, **Universidade Federal da Bahia**, 2003.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. n. 9, 2020.

ORDEIX, L. et al. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 121, 2017.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health, **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 339-345, 2013.

PAZ, G. F. et al. Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. **Acta Tropica**, 2018.

PENNISI, M. et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 302, 2015.

PEREIRA, V. F., et al. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 104-106, 2016.

PETERS, N. C. et al. *In Vivo* Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. **Tópicos avançados em entomologia molecular**, v. 12, p. 1-45, 2012.

PINEDA, C. et al. Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. **PloS One**, v. 12, n. 10, p. 1-18, 2017.

QUARESMA, P. F., et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 289-294, 2009.

QUARESMA, P. F. et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p. 579-585, 2011.

RAMOS, R. A. N., et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in bone marrow, lymph node and spleen of dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 346-350, 2013.

- REGINA-SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2233-2239, 2016.
- REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 7, p. 341-349, 2010.
- 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, L. E. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 498-503, 2013.
- REITHINGER, R. et al. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 1, p. 55-62, 2004.
- RIBEIRO, V. M.. ATUALIZAÇÃO EM LEISHMANIOSES. PROMEVET: Pequenos Animais: Programa de Atualização em Medicina Veterinária. Porto Alegre: Artmed Panamericana, Porto Alegre, p. 75 - 109, 29 jun. 2020.
- RIBEIRO, V. M. et al. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 274, 2019.
- RIBEIRO, R. R. et al. Relação entre sinais clínicos e patológicos e gravidade da leishmaniose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 373-378, 2013a.
- RIBEIRO, V. M. et al. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-2, 2013b.
- RIBEIRO, V. M. et al. Clinical Management of seropositive dogs for visceral leishmaniasis, asymptomatic and with no infecting potential for sand flies. 6th World Congress on Leishmaniasis **WorldLeish6**, 2017.

RIBEIRO, V. M. et al. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 274, 2019.

RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. Em: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais. **Artmed Panamericana**, p. 107-157, 2016.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Clínica Veterinária**, v. 12, n. 71, p. 66-76, 2007.

ROLÃO, N. et al. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1150-1154, 2004.

ROMERO, G. A, BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin americana systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, 2010.

ROSSI, C. N. et al. *In situ* cutaneous cellular immune response in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 48, 2016.

ROURA, X. et al. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: a working group report. **The Veterinary Journal**. v. 198, n. 1, p. 43-47, 2013.

SANCHEZ-ROBERT, E. et al. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 39, n. 3, p. 36, 2008.

SANTOS, J. P. Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da leishmaniose visceral em cães (*Canis familiaris*) provenientes da zona urbana do município de Bom Jesus-PI e região metropolitana do Recife – PE, Brasil. Tese de doutorado em Ciência Veterinária, **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, 2011.

SANTOS, M. N. Leishmaniose visceral canina: análise parasitológica e histopatológica de segmentos de pele de cães naturalmente infectados no município de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe. Dissertação de mestrado em Medicina Tropical, **Instituto Oswaldo Cruz**, 2019.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine Leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 471-489, 2009.

SCHIMMING, B. C.; SILVA, J. R. C. P. Leishmaniose Visceral Canina – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 19, p.01-17, 2012.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. DIVE/SC orienta sobre medidas da leishmaniose visceral. Diretoria de Vigilância Epidemiológica, 2017. Disponível em: <https://www.saude.sc.gov.br/?option=com_content&view=article&id=5813:di>, acessado em: 03/11/2021.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. Zoonoses - Leishmaniose Visceral, 2021. Disponível em: <<https://www.pmf.sc.gov.br/entidades/saude/index.php?cms=zoonoses+++leishmaniose+visceral>>, acessado em: 01/11/2021.

SERAFIM, T. D. et al. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature Microbiology**, v. 3, p. 548–555, 2018.

SEVÁ A. P, et al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PloS one**, v. 11, n. 7, 2016.

SHAKYA, N. et al. Enhancement in therapeutic efficacy of miltefosine in combination with synthetic bacterial lipopeptide, Pam3Cys against experimental Visceral Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 3, p. 377-382, 2012.

SILVA, C. M. H. S.; WINCK, C. A. Leishmaniose Visceral Canina: Revisão de Literatura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 1, 2018.

SILVA, D. A. et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**. v. 179, p. 257–261, 2011.

SILVA, F. S. Patologia e Patogênese da Leishmaniose Visceral Canina. **Revista Tropic Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20, 2007.

SILVA, M. P. et al. Skin reactions to thimerosal and *Leishmania* in dogs from a leishmaniasis endemic area: it is better to keep them apart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 679-681, 2001.

SILVA, R. Levantamento da fauna de flebotomíneos e de sua infecção natural por *Leishmania* sp. em Florianópolis, Santa Catarina. Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. 2019.

SILVA, S. M. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, p. 150-154, 2010.

SILVA, T. A. M. et al. Spatial and temporal trends of visceral leishmaniasis by mesoregion in a southeastern state of Brazil, 2002-2013. **Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, 2017.

SHIMABUKURO, P. H. F., GALATI, E. A. B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropical**, v. 11, 2011.

SOARES-BEZERRA, R. J. et al. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004.

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

SOLANO-GALLEGO, L, et al. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum*. **Vaccines**, v. 33, n. 9, p. 706-717, 2017.

SOUZA, C. S. F. et al. *Leishmania amazonensis* isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in different inbred mice. **Histology and Histopathology**, v. 33, n. 7, p. 705-716, 2018.

- SRIVASTAVA, S. et al. Sarman. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2017.
- STEINDEL, M. et al. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 490-496, 2013.
- SUDARSHAN, M.; SUNDAR, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in India visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 80, n. 1, p. 40-42, 2014.
- TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 294, p. 17-23, 2004.
- TASCA, K. I.; et al. Exames parasitológicos, imunohistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 28-33, 2009.
- TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Cambridge University Press**, v. 145, n. 4, p. 497-507, 2016.
- TEIXEIRA, D. E. et al. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.
- TOEPP A, et al. Randomized, controlled, double-blinded field trial to assess *Leishmania* vaccine effectiveness as immunotherapy for canine leishmaniosis. **Vaccine**, 2018.
- TRAVI, B. L. et al. Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, 2018.
- TUPPERWAR, N. et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, p. 23-30, 2008.
- ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464-480, 2017.

UNGER, C, et al. Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. **Acta Oncologica**, v. 28, n. 2, p. 213–217, 1989.

VERCAMMEN, F. et al. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. **Acta Tropica**, v. 84, p. 175-181, 2002.

VERÇOSA, B. L. A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 45, 2008.

WERNECK, G. L. Geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2937-2940, 2008.

WHO. A Tripartite Guide to Addressing Zoonotic Diseases in Countries. 2019.

WHO. Leishmaniasis. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>, acessado em: 14/03/2022.

WHO. Status of endemicity of cutaneous and visceral leishmaniasis: 2020. 2021. Disponível em: <https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html>, acessado em: 14/03/2022.

YIMAM, Y.; MOHEBALI, M. Effectiveness of insecticide-impregnated dog collars in reducing incidence rate of canine visceral leishmaniasis: A systematic review and metaanalysis. **PLoS ONE**, v. 15, n. 9, 2020.

APÊNDICE 1- DADOS GERAIS DOS CÃES PARTICIPANTES DO PROJETO

Nº Cão UFSC	Nome	Sexo	Raça	Idade	Local de origem	Porte	Pelagem	Domicílio
1	Giuseppe	M	SRD	3 anos	Itacorubi	grande	curta	intradomicílio
2	Café	M	SRD	4 anos	Joaquina	grande	curta	peridomicílio
3	Do Céu	M	SRD	12 anos	Saco dos Limões	grande	curta	peridomicílio
4	Snow	M	Labrador	4 anos	Itacorubi	grande	média	semidomiciliado
5	Otto	M	SRD	7 anos	Barra da Lagoa	grande	curta	peridomicílio
6	Jack	M	SRD	5 anos	Itacorubi	grande	média	intradomicílio
7	Tchopo	M	Boxer	1,3 anos	Vargem do Bom Jesus	grande	curta	peridomicílio
8	Lucca	M	SRD	6 anos	Rio Tavares	grande	curta	peridomicílio
9	Antônio	M	SRD	8 anos	Rio Vermelho	médio	curta	peridomicílio
10	Mel	F	SRD	4 anos	Itacorubi	grande	curta	peridomicílio
11	Mingo	M	SRD	4 anos	Rio Tavares	médio	curta	semidomiciliado
12	Quindim	M	Golden	10 meses	Itacorubi	grande	média	intradomicílio
13	Skye	F	SRD	4 anos	Sambaqui	Grande	curta	peridomicílio
14	Hebe	F	SRD	2 anos	Daniela	pequeno	curta	semidomiciliado
15	Bob	M	SRD	11 anos	Armação	grande	curta	peridomicílio
16	Zoe	F	Shitzu	5 meses	São José	pequeno	longa	intradomicílio
17	Nutella	F	SRD	7 anos	Ingleses	pequeno	curta	intradomicílio
18	Julha	F	Pastor Alemão	2 anos	Rio Vermelho	grande	média	peridomicílio
19	Zion	M	Pastor Alemão	4 anos	João Paulo	grande	média	peridomicílio
20	Pulga	M	SRD	10 anos	Cacupé	pequeno	média	semidomiciliado
21	Branca	F	SRD	6 anos	Costeira	médio	curta	intradomicílio
22	Cleytinho	M	SRD	5 anos	Itacorubi	médio	média	intradomicílio
23	Armani	M	Border Collie	5 anos	Canto da Lagoa	grande	longa	peridomicílio
24	Shiva	F	Border Collie	6 anos	Canto da Lagoa	grande	longa	peridomicílio

**APÊNDICE 3 - EXAMES LABORATORIAIS E ESTADIAMENTO CLÍNICO DOS
CÃES PARTICIPANTES DO PROJETO ANTES DO TRATAMENTO (T0)**

Nº Cão UFSC	Hematócrito	Proteína			Creatinina	Ureia	ALT	AST	FA	Estadiamento
		Total	Albuminas	Globulinas						
1	29	5,8	1,8	4	1,1	14	18	20	203	Estádio II
2	47	6,4	3,3	3,1	1,2	-	26	-	-	Estádio I
3	44	6,4	2,7	3,8	1	42	31	-	64	Estádio I
4	28	9,5	2,3	7,2	1	32	18	40	75	Estádio II
5	41	6,4	2,8	3,6	1,3	30	40	-	63	Estádio I
6	31	6,8	3,1	3,7	1	23	27	-	-	Estádio II
7	36	10	-	-	0,71	-	-	-	-	Estádio II
8	39	8,2	-	-	2,08	75	29	68	-	Estádio III
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Estádio IV
10	31	9	1,36	-	4,57	330	47	33	52	Estádio IV
11	45	7,5	2,9	4,6	1,3	30	27	50	62	Estádio II
12	31	9,4	1,89	-	0,8	60	24	-	50	Estádio I
13	27	-	-	-	1,04	77	24	-	46	Estádio III
14	40	11,5	2,5	9	0,6	26	31	52	100	Estádio III
15	24,8	9	2,6	6,4	0,5	23	37	98	-	Estádio III
16	28,7	7,8	-	-	-	-	-	-	-	Estádio II
17	32	8,65	2,85	5,8	0,67	-	202	-	955	Estádio III
18	34	8,4	2,8	5,17	0,56	43	59	47	21	Estádio III
19	23,9	9	2,5	6,5	1	23	30	46	108	Estádio III
20	35	9,33	2,43	6,9	0,8	32	25	34	63	Estádio IV
21	42	8,8	2,9	5,2	0,61	23	37	-	165	Estádio II
22	33	10,6	2,6	-	1	28	21	-	88	Estádio II
23	47	7,3	3,2	4,1	1,8	50	140	86	65	Estádio II
24	33	8,4	2,6	5,8	1	23	40	-	25	Estádio III

**APÊNDICE 4- LOTE DO MILTEFORAN® UTILIZADO PELOS CÃES POSITIVOS
PARA LVC PARTICIPANTES DO PRESENTE ESTUDO.**

Nº Cão UFSC	Nº de Série Caixa	Lote Milteforan®
1	A2JLG8QPN	Part 002/18 Fabr out/18 Venc Set/20 83905504
2	-	Part 002/18 Fabr out/18 Venc Set/20 83905504
3	SGL443Z&K	Part 002/19 Fabr Jan/19 Venc Dez/20 83905704
4	2AAM7044J	Part 004/19 Fabr mai/19 Venc Abr/21 83905704
5	CW5SK690	Part 004/19 Fabr mai/19 Venc Abr/21 83905704
6	8D1056921	Part 007/20 Fabr Nov/20 Venc Out/22 83905505
7	HL95EW06	Part 004/19 Fabr mai/19 Venc Abr/21 83905704
8	E87TS4L4L	Part 004/19 Fabr mai/19 Venc Abr/21 83905505
9	09JLEIMN9	Part 003/20 Fabr Jul/20 Venc Jun/22
10	-	Part 009/19 Fabr out/18 83905704
11	20XJVYI9H	Part 002/20 Fabr Fev/20 Venc Jan/22 83905505
12	6G36P2V70/RHE2A2W48	Part 007/20 Fabr Nov/20 Venc Out/22 839055505
13	ON539PD3Q	Part 006/20 Fabr Nov/20 Venc Out/22 83905505
14	G59E1AQK0	Part 007/20 Fabr Nov/20 Venc Out/22 83905205
15	CR6RY723J	Part 007/20 Fabr Nov/20 Venc Out/22 83905505
16	20QOVI9JM	Part 007/20 Fabr Nov/20 Venc Out/22 83905205
17	3220N7342	Part 007/20 Fabr Nov/20 Venc Out/22 83905505
18	ZA6T0DIQV	Part 001/21 Fabr Jan/21 Venc Dez/22 83905705
19	9IWVE997R	Part 001/21 Fabr Jan/21 Venc Dez/22 83905705
20	08009U7RJ1	Part 001/21 Fabr Jan/21 Venc Dez/22 83905705
21	PK79BL065	Part 001/21 Fabr Jan/21 Venc Dez/22 83905505
22	32SSCZ670	Part 001/21 Fabr Jan/21 Venc Dez/22 83905205
23	88MP1340Q	Part 001/21 Fabr Jan/21 Venc Dez/22 839057505
24	VLB0G8QCP	Part 001/21 Fabr Jan/21 Venc Dez/22 83905505

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA - MIP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Para estudo de Leishmaniose Visceral Canina – LVC - em Florianópolis)

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome do Tutor:.....
Documento de identidade:..... Órgão expedidor:.....
Data de nascimento:/...../.....
Endereço:
.....
.....
CEP:
Cidade:..... Estado:..... Fone: (.....).....

2. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

21 Título: “Estudo da eficácia do Milteforan no tratamento da leishmaniose visceral canina no Município de Florianópolis, SC: Avaliação de aspectos celulares e moleculares relacionados à resistência ao tratamento”

22 Investigadores Principais: Amábilli de Souza Rosar, Viviane Noll Louzada Flores, Dr. Edmundo Carlos Grisard, Dr^a. Patrícia Hermes Stoco; Dr^a. Patrícia Flávia Quaresma e Dr. Mario Steindel.

3. EXPLICAÇÕES DOS PESQUISADORES AO TUTOR DO PACIENTE (CÃO)

O seu cão está sendo convidado pela Veterinária Amábilli de Souza Rosar e pela Biotecnóloga Viviane Noll Louzada Flores, pesquisadoras da Universidade Federal de Santa Catarina, a participar do estudo intitulado “Estudo da eficácia do Milteforan no tratamento da leishmaniose visceral canina: Aspectos celulares e moleculares da resistência ao tratamento”.

O seu cão foi selecionado para participar do estudo por ter sido diagnosticado como sororeagente para a doença chamada “leishmaniose

1

visceral” e ser elegível para tratamento com Milteforan (miltefosina), único medicamento aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), conforme apontado pelo veterinário que atende o seu animal. A participação do seu cão é voluntária e a qualquer momento você pode optar por retirá-lo do estudo e expungir seu consentimento. A sua recusa não trará prejuízos em relação ao tratamento do seu animal ou à UFSC.

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença infecciosa causada por um parasito denominado *Leishmania infantum*, o qual é transmitido entre animais e seres humanos por meio da picada de fêmeas de um grupo de insetos sugadores de sangue denominados flebotomíneos. Segundo o Ministério da Saúde - MS (2014), o cão (*Canis familiaris*) com a doença é a principal fonte de infecção para os insetos transmissores em área urbana. Desta forma, as fêmeas dos flebotomíneos picam os cães infectados e podem transmitir a doença para outros cães sadios e seres humanos. Esta doença, que acomete tanto cães como seres humanos, já é registrada no Município de Florianópolis desde 2010. Os cães infectados podem não apresentar sinais clínicos da doença por longos períodos de tempo, mas ainda assim são fonte de infecção ao inseto transmissor. O correto diagnóstico da LVC pode ser realizado por um profissional veterinário com base nos sinais clínicos e confirmado por exame sorológico (busca de anticorpos contra o parasito) no sangue do cão, parasitológico (encontro do parasito) em uma amostra de tecido colhido do cão, e/ou moleculares (encontro do DNA do parasito) (RIBEIRO *et al.*, 2013).

Em 2016, o MAPA autorizou o uso do medicamento Milteforan no Brasil como método terapêutico para os cães soropositivos para a LVC (VIEGAS, 2018). O tratamento para LVC tem como finalidade principal a redução da carga parasitária, a restauração da resposta imunológica e a melhora do estado geral do animal, sendo necessário um acompanhamento clínico durante toda a vida do mesmo e a repetição/manutenção do tratamento se indicado pelo médico veterinário (OLIVA *et al.*, 2010).

O estudo que apresentamos neste momento tem por objetivo a verificação da efetividade do tratamento com o Milteforan na redução da carga parasitária em seu cão. Para tanto, analisaremos a persistência do parasito e a capacidade de resistência do mesmo ao medicamento, indicando a você e ao seu veterinário a eficácia do tratamento do seu cão. Para que seja possível estudar se esse parasito que circula em Florianópolis apresenta resistência ao medicamento, são necessárias amostras de sangue e amostras de biópsias de linfonodos e de pele de seu cão antes e após o

tratamento proposto pelo médico veterinário em atenção às normas e diretrizes propostas pelo MS e pelo MAPA.

Esse estudo será realizado em conjunto com o médico veterinário responsável por seu cão, o qual utilizará protocolos de anestesia local e materiais estéreis, não incorrendo em dor ou em risco de morte de seu animal. Para a realização do estudo, necessitamos coletar antes do início do tratamento, no término da terapêutica com miltefosina (31 dias) e 6 meses após a última dose do tratamento, as seguintes amostras: 4 a 5 ml de sangue venoso; 2 amostras de pele da região da barriga que serão coletadas por meio de biópsia retirando fragmentos de 5 mm de diâmetro e biópsia aspirativa de linfonodo, utilizando-se agulha e seringa estéreis. Essas amostras serão utilizadas para verificar a presença do parasito, o isolamento do mesmo em meio de cultura e verificação de sua resistência ao medicamento. As amostras serão registradas, analisadas e armazenadas no Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC) e serão utilizadas somente para o estudo proposto.

Os possíveis desconfortos para o animal constam de 1) dor à picada da agulha com anestésico local a ser aplicado na região das biópsias, 2) dor à picada da agulha para retirada de sangue venoso e 3) coceira/incômodo na região das biópsias em função de sua cicatrização, não sendo identificados outros riscos ao seu cão.

O benefício de estar participando desse estudo consiste no conhecimento da eficácia do tratamento que seu animal está recebendo com este medicamento novo no mercado brasileiro e na geração de conhecimento acerca do desenvolvimento de resistência do parasito ao medicamento utilizado no tratamento da leishmaniose visceral canina no município de Florianópolis. Você, o médico veterinário, os responsáveis pelo estudo e a UFSC não receberão nenhum incentivo financeiro para este estudo, de forma que você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa com um laudo indicando a eficácia do tratamento de seu cão, além de contribuir com o avanço científico no conhecimento desta doença. As despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. No entanto, as despesas referentes ao tratamento do seu cão não serão de responsabilidade da UFSC ou dos responsáveis pela pesquisa. Se você concordar em participar do estudo, todas as informações coletadas tanto de seu animal como as suas informações pessoais são confidenciais e em nenhuma hipótese poderão ser divulgadas, sendo utilizadas exclusivamente no presente estudo.

4. CONTATO

Se você, tutor, tiver qualquer pergunta ou consideração sobre o estudo, por favor, vamos esclarecer isso neste momento. Mesmo assim se você desejar esclarecer suas dúvidas sobre a pesquisa, sinta-se a vontade para contatar os pesquisadores responsáveis no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Dr. Edmundo Carlos Grisard (MIP/CCB/UFSC, sala 319, Fone: + (48) 3721-2955 E-mail: edmundo.grisard@ufsc.br), Dr. Mário Steindel (MIP/CCB/UFSC, sala 301, Fone: + (48) 3721-2958 E-mail: mario.steindel@ufsc.br), Dr^a. Patrícia Hermes Stoco (MIP/CCB/UFSC, sala 312, Fone: + (48) 3721-2957 E-mail: patricia.stoco@ufsc.br) ou Dr^a. Patrícia Flávia Quaresma (MIP/CCB/UFSC, sala 318, Fone: + (48) 3721-4584 E-mail: patricia.quaresma@ufsc.br).

Caso deseje maiores esclarecimentos em relação à ética do estudo, por favor, entre em contato com a **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** da Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-400, Prédio Reitoria II, Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC, Contato: (48) 3721-6093, E-mail: ceua.propesq@contato.ufsc.br

5. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ declaro que recebi as devidas explicações de que meu cão, de nome _____, raça _____, sexo _____, pelagem _____ e idade aproximada de _____ anos

será um dos participantes dessa pesquisa e entendo todas as suas etapas e objetivos, concordando com o que me foi exposto. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança terá lido este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome e a data do preenchimento. E, por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresse meu consentimento para meu cão participar deste estudo.

_____ Assinatura do participante

____ / ____ / ____ Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

Nome de quem aplicou o TCLE: _____

Assinatura: _____

Data ____ / ____ / ____