

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: REVISÃO DE LITERATURA

CAROLINA SBARAINI OLIVEIRA

PORTO ALEGRE

2018/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Autor: Carolina Sbaraini Oliveira

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial
para a obtenção da graduação em
Medicina Veterinária**

Orientador: Profa. Dra. Ana Cristina
Pacheco de Araújo

PORTO ALEGRE

2018/2

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma zoonose em expansão no Brasil, tendo grande importância em saúde pública. É causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp. e a transmissão da doença ocorre através da picada da fêmea do mosquito *Lutzomyia longipalpis*, chamado popularmente de “mosquito palha”. Anteriormente considerada como uma doença de áreas rurais, atualmente se expandiu para o meio urbano como resultado do crescimento desordenado das cidades e aglomerados de pessoas em condições precárias de saneamento e saúde. No ambiente doméstico, o cão é considerado o principal reservatório do parasita. Os sinais clínicos nos cães são inespecíficos e semelhantes a outras patologias. O diagnóstico pode ser realizado através de testes sorológicos, parasitológicos e moleculares. Recentemente foi liberado no Brasil o tratamento de cães com o princípio ativo miltefosina, sendo uma alternativa à eutanásia dos cães soropositivos preconizada como método de controle da doença pelo Ministério da Saúde. A vacinação dos cães e utilização de coleiras impregnadas com produtos repelentes compreendem métodos de profilaxia individual. Pela complexidade da epidemiologia e do controle da doença, as medidas adotadas para conter a sua disseminação no país têm se mostrado pouco efetivas. O objetivo desse trabalho é fazer uma revisão bibliográfica sobre a leishmaniose visceral canina, sua epidemiologia, principais sinais clínicos, métodos de diagnóstico, protocolos terapêuticos e estratégias atuais de prevenção.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, cães, zoonose

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is an expanding zoonosis in Brazil, with great importance in public health. It is caused by protozoa of the genus *Leishmania* spp. and transmission of the disease occurs through the bite of the female mosquito *Lutzomyia longipalpis*, popularly called "mosquito palha". Previously considered a disease of rural areas, it is now expanding into the urban environment as a result of the disorderly growth of cities and clusters of people in poor sanitation and health conditions. In the domestic environment, the dog is considered the main reservoir of the parasite. The clinical signs in dogs are nonspecific and look like other pathologies. Diagnosis can be made through serological, parasitological and molecular tests. Recently, the treatment of dogs with miltefosina product was released in Brazil, being an alternative to the euthanasia of the seropositive dogs, recommended as a method of disease control by the Ministry of Health. The vaccination of dogs and the use of collars impregnated with repellent products comprise methods of individual prophylaxis. Due to the complexity of the epidemiology and the control of the disease, the measures adopted to contain its spread in the country have been shown to be ineffective. The objective of this work is to make a literature review on canine visceral leishmaniasis, its epidemiology, main clinical signs, diagnostic methods, therapeutic protocols and current prevention strategies.

Keywords: visceral leishmaniasis, dogs, zoonosis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	EPIDEMIOLOGIA	7
2.1	Agente etiológico	7
2.2	Posição taxonômica	7
2.3	Vetor	8
2.4	Reservatórios	9
2.5	Ciclo biológico e transmissão	10
3	ASPECTOS CLÍNICOS, FISIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS	13
3.1	Suscetibilidade e imunidade	13
3.2	Aspectos clínicos	14
4	DIAGNÓSTICO	18
4.1	Diagnóstico clínico	18
4.2	Diagnóstico laboratorial	18
4.2.1	Diagnóstico sorológico	20
4.2.1.1	ELISA	21
4.2.1.2	RIFI.....	22
4.2.2	Diagnóstico parasitológico	22
4.2.3	Diagnóstico molecular	23
5	TRATAMENTO	25
5.1	Estadiamento	26
5.2	Fármacos de manutenção	28
5.3	Imunoestimulantes	29
6	PREVENÇÃO E CONTROLE	30
6.1	Controle do vetor	31
6.2	Controle na população canina	31
6.2.1	Vacinas	33
6.3	Educação em saúde	34
7	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina é uma doença zoonótica causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, sinônimo de *Leishmania chagasi* no Novo Mundo, responsável também por causar formas viscerais e cutâneas de leishmaniose em humanos, e é transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (BANETH *et al.*, 2008; ELSHEIKHA, 2016). A doença é endêmica em mais de 98 países, principalmente na região do Mediterrâneo, África, Ásia Meridional e América Latina, afetando mais de 1 milhão de pessoas por ano e causando riscos significativos à saúde pública (ELSHEIKHA, 2016). O cão doméstico é considerado o principal reservatório peridoméstico de infecção humana (DANTAS-TORRES, 2009). Porém, animais silvestres, equídeos, roedores e o gato podem ser encontrados naturalmente infectados (ELSHEIKHA, 2016).

Anteriormente caracterizada como uma doença de áreas rurais, a leishmaniose vem se tornando endêmica em grandes cidades brasileiras desde a década de 1980 (COSTA *et al.*, 2003), apresentando uma importância significativa no contexto epidemiológico em decorrência do processo de urbanização e das alterações no ambiente natural (COSTA *et al.*, 2003). A doença é considerada endêmica nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil e, mais recentemente, também na região Sul (FIGUEIREDO, 2012). O processo desordenado de ocupação urbana, associado a baixas condições socioeconômicas e saneamento precário, promovem condições favoráveis para reprodução do flebotomíneo e a disseminação da doença (RANGEL; VILELA, 2008).

Nos cães, o parasitismo é abundante nas vísceras e na derme, porém, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo, servindo como fonte de infecção para o vetor (WHO, 2007). Cães que apresentam a doença podem manifestar diferentes sinais clínicos e graus variados de severidade (BANETH *et al.*, 2008). Os sinais associados à infecção por *Leishmania* em cães incluem linfadenomegalia, alopecia, dermatite, anorexia, perda de peso, conjuntivite, epistaxe, anemia, esplenomegalia e hepatomegalia. As manifestações atípicas incluem lesões na mucosa, colite crônica e lesões osteolíticas e osteoproliferativas (ELSHEIKHA, 2016).

O diagnóstico da leishmaniose é obtido principalmente com base nos sinais clínicos, detecção sorológica de resposta imune específica contra *Leishmania*, exames citológicos e detecção molecular do DNA do parasita (ELSHEIKHA, 2016). O diagnóstico correto e precoce é essencial para instituição oportuna do tratamento e para minimizar a possibilidade de transmissão do parasita de animais infectados a vetores (ELSHEIKHA, 2016). Medidas de

prevenção como o controle do vetor e ações de educação em saúde são realizadas em áreas de transmissão da doença. Nas áreas endêmicas, o Ministério da Saúde preconiza para o controle do reservatório canino a realização de inquérito sorológico e eutanásia em cães sororreagentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Atualmente no Brasil, o fármaco Milteforan® é o único medicamento liberado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o tratamento de cães (VIRBAC, 2017), tornando-se uma medida alternativa à eutanásia. Todavia, o alto custo da droga pode inviabilizar o tratamento, que exige acompanhamento veterinário regular e se estende até o fim da vida do cão. A vacinação também está disponível para cães, compreendendo um método de profilaxia individual (ELSHEIKA, 2016), assim como o uso de colares impregnados com deltametrina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No presente trabalho procurou-se fazer uma revisão bibliográfica sobre a leishmaniose visceral canina, sua epidemiologia, principais métodos de diagnóstico disponíveis e suas limitações, protocolos terapêuticos e estratégias de prevenção e controle atuais.

2 EPIDEMIOLOGIA

2.1 Agente etiológico

A leishmaniose visceral canina (LVC) é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, pertencentes a família *Trypanosomatidae*, que afetam cães de diversos continentes (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A classificação mais aceita é a de Lainson e Shaw (1987) que se baseia no local de desenvolvimento do parasita no intestino do vetor. Assim, o gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Leishmania*, no qual a reprodução ocorre nos intestinos médio e anterior (cranial), e *Viannia*, no qual há uma fase adicional de desenvolvimento do protozoário no intestino posterior (caudal) (COURA, 2005).

Embora cães tenham sido encontrados infectados por pelo menos 12 espécies de *Leishmania*, o agente etiológico mais importante é a *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*), que também causa doença visceral e cutânea em humanos em vários países (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

As leishmanias apresentam comportamento dimórfico, ou seja, a fase do ciclo de vida do parasita define sua forma estrutural. A forma móvel, extracelular, flagelada, encontrada no trato gastrointestinal do vetor é chamada promastigota. A outra forma, intracelular e não móvel, é denominada amastigota (COURA, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As formas visceral, cutânea e mucosa das leishmanioses são resultado principalmente do tropismo das espécies por determinados sítios do organismo como a pele, mucosas ou vísceras, mas também decorrem da interação entre a resposta imune do hospedeiro e o parasita. Dessa forma, espécies que não são habitualmente viscerotrópicas podem eventualmente causar formas viscerais, conforme a capacidade de defesa do organismo (COURA, 2005).

2.2 Posição taxonômica

A posição taxonômica do gênero *Leishmania* pode ser verificada na Figura 1.

No momento existem divergências sobre o uso do nome específico *chagasi* para o agente etiológico da leishmaniose visceral na América. Com base nos perfis isoenzimáticos, alguns autores consideram que *Leishmaniachagasi* é igual à *Leishmania infantum* e, por isso,

o nome *chagasi* seria sinônimo de *infantum* (DANTAS-TORRES, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Aqui a espécie causadora da leishmaniose visceral canina no continente americano será tratada como *L. infantum* (= *L. chagasi*).

Figura 1 – Quadro que demonstra a posição taxonômica do gênero *Leishmania*, seus descobridores e datas.

Reino: Protista (Haeckel, 1866).
Sub-reino: Protozoa (Goldfuss, 1817).
Filo: Sarcomastigophora (Honigberg & Balamuth, 1963).
Subfilo: Mastigophora (Deising, 1866).
Classe: Zoomastigophorea (Calkins, 1909).
Ordem: Kinetoplastida (Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976).
Subordem: Trypanosomatina (Kent, 1880).
Família: Trypanosomatidae (Dofein, 1901, emend. Grobden 1905).
Gênero: Leishmania (Ross, 1903).
Subgênero: Leishmania (Safyanova, 1982).
Espécie: infantum (Nicolle, 1908) syn. chagasi (Cunha & Chagas, 1937).

Fonte: Banuls, Hide e Prugnolle (2007).

2.3 Vetor

Os vetores da leishmaniose visceral são insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor de *L. infantum* em todo Novo Mundo, incluindo o Brasil (SHARMA *et al.*, 2008).

Por muito tempo, a leishmaniose canina era considerada como sendo uma doença de áreas rurais (DANTAS-TORRES, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), mas isso vem se modificando. O vetor *L. longipalpis* é difundido na América (YOUNG; DURAN, 1994) e é adaptado a colonizar ambientes modificados pelo homem (LAISON; RANGEL, 2005). No

Brasil a distribuição geográfica de *L. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Atualmente, a doença já é bem estabelecida em grandes áreas urbanizadas (DANTAS-TORRES, 2009; DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Esses insetos são pequenos, medindo de 1 a 3 mm de comprimento. Possuem o corpo revestido por pelos e são de coloração castanho claro ou cor de palha (Figura 2). Na fase adulta, estão adaptados a diversos ambientes, porém na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica com baixa incidência luminosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A condição climática na maioria dos focos de LVC no Novo Mundo permitem o desenvolvimento do flebotomíneo durante o ano todo. No entanto, flutuações na densidade populacional dos vetores podem ser observadas com picos ocorrendo durante ou após períodos de chuva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; RESENDE *et al.*, 2006; SARAIVA *et al.*, 2011).

Figura 2 – Imagem da fêmea de *Lutzomyia longipalpis*.



Fêmea ingurgitada de *Lutzomyia longipalpis*, vetor responsável pela disseminação de *L. infantum*.

Fonte: Ministério da Saúde (2014).

Apenas as fêmeas de *L. longipalpis* são hematófagas e, portanto, têm importância epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), podendo realizar o repasto sanguíneo em várias espécies de animais vertebrados (DANTAS-TORRES, 2009), o que inclui cães e humanos. A atividade dos adultos dessa espécie é crepuscular e noturna (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SHARMA *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

2.4 Reservatórios

Reservatórios vertebrados de *L. infantum* incluem uma variedade de animais silvestres e domésticos, incluindo roedores, marsupiais, primatas, edentados e carnívoros. Os hospedeiros primários são mamíferos silvestres, como roedores e canídeos silvestres (DANTAS-TORRES, 2007). Com o crescente processo de urbanização do ciclo zoonótico de transmissão das leishmanioses, os animais sinantrópicos e domésticos assumiram um papel importante como reservatórios de infecção. Os cães são considerados os principais reservatórios de *L. infantum* no ambiente doméstico (DANTAS-TORRES, 2007).

Assim como os cães domésticos, caninos selvagens são muito suscetíveis a infecção por *L. infantum* e eventualmente morrem por leishmaniose (BECK *et al.*, 2008). Esse fato motivou a busca por hospedeiros alternativos para *L. infantum*, e uma infinidade de animais selvagens, como pequenos roedores e gambás (*Didelphis* spp.) foram considerados como potenciais reservatórios do parasita na América do Sul (QUINNEL; COURTENAY, 2009). O gato é comumente considerado um hospedeiro incomum para a infecção por leishmania e apenas relatos esporádicos de casos de leishmaniose felina se originaram principalmente de países onde o organismo e diferentes espécies de vetores flebotomíneos são endêmicos (COELHO *et al.*, 2010; PENNISI, 2002; SOUZA *et al.*, 2009).

Isso sugere que os programas de controle focados na eliminação de cães podem ser ineficazes se seres humanos e outros animais podem servir como fonte do parasita para os flebotomíneos (COSTA *et al.*, 2002; DANTAS-TORRES, 2007; MAROLI *et al.*, 2007). Na presença de tal número de potenciais hospedeiros, o papel epidemiológico desempenhado por cada um desses animais pode ser difícil de determinar.

2.5 Ciclo biológico e transmissão

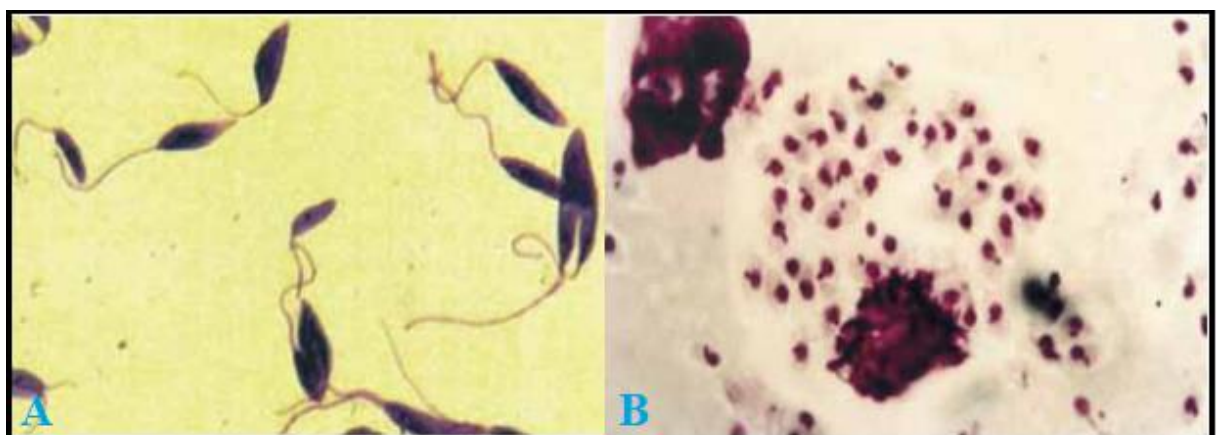
Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo biológico heteroxênico, necessitando assim de dois hospedeiros, um vertebrado, representado principalmente por canídeos silvestres e domésticos, além de roedores e humanos, e de um invertebrado, representado pelo inseto vetor (SILVA, 2007).

O vetor, ao picar o hospedeiro vertebrado infectado, ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas (Figura 3) da *Leishmania*. No trato digestório do parasita, ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas (Figura

3), que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária (COURA, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas, as quais colonizam o intestino médio e anterior (cranial) do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes, as promastigotas metacíclicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SHARMA *et al.*, 2008).

Após esta diferenciação, os hospedeiros vertebrados e reservatórios são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são inoculadas juntamente com a saliva das fêmeas dos insetos vetores durante o repasto sanguíneo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SARIDOMICHELAKIS, 2009; SHARMA *et al.*, 2008). Ao se alimentar, o inseto também inocula sua saliva que exerce o papel de anticoagulante, vasodilatador, anestésico local e antiagregação plaquetária, além de efeitos quimiotáticos para monócitos e imunorreguladores com capacidade de interagir com os macrófagos, aumentando sua proliferação e impedindo a ação efetiva destas células na destruição dos parasitos (SARIDOMICHELAKIS, 2009). Na epiderme do hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas por células de defesa do sistema mononuclear fagocitário e transportados até os linfonodos regionais (SARIDOMICHELAKIS, 2009). No interior dos macrófagos, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente por divisão binária até causar seu rompimento, ocorrendo a liberação de parasitos que serão fagocitados por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos, principalmente aqueles ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (COURA, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Figura 3 – Imagem histológica do protozoário causador da leishmaniose visceral.



Forma promastigota (A) e amastigota (B) de protozoários do gênero *Leishmania*.
Fonte: Ministério da Saúde, 2014.

Apesar do fato de que o flebotomíneo permanecerá infectado por toda a vida (algumas semanas), ele pode transmitir com sucesso a infecção apenas a alguns animais (SHARMA *et al.*, 2008). O vetor se alimenta dos cães principalmente em áreas de pele com pouco pelo, como a cabeça, ponta do nariz, pina da orelha e áreas inguinal e perianal (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Outras formas de transmissão já foram sugeridas na literatura incluindo transmissão transplacentária e transmissão venérea (BOGGIATTO *et al.*, 2011; DANTAS-TORRES, 2009; NAUCKE; LORENTZ, 2012). A transmissão iatrogênica também pode ocorrer pela transfusão de sangue contaminado (FREITAS *et al.*, 2006). Entretanto, a relevância dessas formas de transmissão alternativas é desconhecida. De maneira similar, pulgas e carrapatos têm sido considerados como supostos vetores de *L. infantum* no Brasil, mas uma prova concreta de que eles são vetores competentes do parasita nunca foi fornecida, não tendo impacto na transmissão da doença, pois se acredita na existência de certa especificidade do vetor para as *Leishmanias* (DANTAS-TORRES, 2009).

3 ASPECTOS CLÍNICOS, FISIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Os parasitas de *Leishmania* podem infectar diversos tipos diferentes de células. As principais células parasitadas são as do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos e células de Kupffer. Entretanto, as leishmanias podem atingir ainda 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. Embora sejam capazes de parasitar diversas células, os macrófagos são considerados as principais células hospedeiras do parasita e responsáveis por contribuir para sua sobrevivência a longo prazo (SARIDOMICHELAKIS, 2009).

A patogênese da LVC se dá principalmente através de inflamação granulomatosa em resposta à presença do parasita e/ou mecanismos imunomediados, como produção de autoanticorpos ou deposição de imunocomplexos que se depositam em diversos tecidos gerando lesões inflamatórias. Muitos tecidos e órgãos diferentes do corpo podem ser afetados. (FERRER, 2002; SARIDOMICHELAKIS, 2009; SILVA, 2007).

A inflamação granulomatosa é caracterizada por infiltração e/ou proliferação de macrófagos, histiócitos, linfócitos, plasmócitos e até mesmo neutrófilos e eosinófilos, acometendo linfonodos, medula óssea, baço, fígado, intestino, ossos, sistema genital e mucosas (FERRER 2002; SARIDOMICHELAKIS, 2009). Por outro lado, os mecanismos imunomediados têm papel central na patologia renal. Ambos os mecanismos são de igual importância para lesões de pele, lesões musculares, articulares e oculares (SARIDOMICHELAKIS, 2009).

3.1 Suscetibilidade e imunidade

Até o momento, não foi verificada predisposição racial, sexual ou etária relacionada com a infecção do animal. A ocorrência ou não da disseminação do parasita após a infecção depende da resistência do hospedeiro sendo que em cães suscetíveis, após a infecção da pele, os parasitas podem se disseminar em questão de horas, com posterior desenvolvimento dos sintomas, enquanto que em cães resistentes podem permanecer localizados na pele e nos linfonodos regionais por longos períodos. Assim, dependendo de propriedades tanto do parasita como do hospedeiro, a leishmaniose canina irá se desenvolver de uma forma aguda ou crônica (FERRER, 2002, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

De vários fatores conhecidos, a resposta dos linfócitos T é que exerce a maior influência sobre a infecção. Como a *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório, as defesas do hospedeiro são dependentes da atividade dessas células, que se encontram reduzidas durante a infecção. Em contrapartida, há a proliferação intensa de linfócitos B e a produção de anticorpos é abundante, porém é deletéria e não protetora. Devido à imunidade ineficaz mediada por células, os cães que desenvolvem a doença apresentam maior carga parasitária nos tecidos quando comparados com cães infectados assintomáticos, independente da metodologia utilizada para detecção dos parasitas (SARIDOMICHELAKIS, 2009). A concentração de anticorpos IgG anti-*Leishmania* específicos está diretamente relacionada com a carga parasitária nos tecidos e com a gravidade clínica da doença, sendo geralmente menor em cães assintomáticos do que em cães que desenvolvem a doença (SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Portanto, o aparecimento dos sinais clínicos vai depender da imunocompetência do animal. Geralmente a doença no cão é sistêmica e crônica, no entanto, a evolução aguda e grave pode levar o animal ao óbito em poucas semanas (MICHALICK; GENARO, 2005; SILVA, 2007). Em alguns cães a doença pode permanecer latente, levando inclusive à cura espontânea. No Brasil, a forma assintomática da doença é encontrada com índices variados, geralmente representando 40 a 60% de uma população soropositiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O período de incubação no cão é bastante variável, de três meses a vários anos com média de três a sete meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

3.2 Aspectos clínicos

A infecção em cães por espécies de *Leishmania* é clinicamente semelhante à infecção humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele nos animais infectados e sintomáticos (KRAUSPENHAR *et al.*, 2007).

Inicialmente surge febre intermitente, perda de peso e linfadenopatia (LIMA *et al.*, 2004). Anemia, caquexia (Figura 4), hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia e lesões de pele como alopecia multifocal e úlceras crostosas, principalmente na região da orelha, focinho e periorbita (Figura 4), são os principais sinais clínicos (KRAUSPENHAR *et al.*, 2007; LINHARES *et al.*, 2005), sendo a pele um órgão importante na determinação do progresso da infecção por *Leishmania* (SILVA, 2007).

Nos órgãos linfoides ocorre a proliferação linfoplasmohistiocitária, resultando na linfadenomegalia generalizada (KRAUSPENHAR *et al.*, 2007). Nos linfonodos há hipertrofia das regiões corticais e medulares e presença de muitos macrófagos infectados (LIMA *et al.*, 2004). O resultado final é a linfadenopatia periférica, um dos sinais mais típicos da leishmaniose visceral canina (CIARAMELLA; CORONA, 2003). Entretanto, nos estágios avançados da doença, especialmente em cães com doença renal, os linfonodos podem normalizar de tamanho ou até mesmo tornar-se hipoplásicos, acompanhando o quadro geral de perda da condição corporal (GIUNCHETTI *et al.*, 2008; KOUTINAS *et al.*, 1999). Na medula óssea é característico a hipertrofia e a hiperplasia das células (KRAUSPENHAR *et al.*, 2007; TAFURI *et al.*, 2001). A hipoplasia e aplasia medular podem resultar em anemia e trombocitopenia. A esplenomegalia é causada pela proliferação e infiltração de células imunes e hiperplasia da polpa branca e vermelha, além de alterações na estrutura microvascular (FERRER, 2002).

Figura 4 – Imagem de um cão com manifestações clínicas da leishmaniose visceral



(a) lesão mucocutânea no focinho e (b) caquexia.
Fonte: Dantas-Torres (2009).

Lesões oculares como queratoconjuntivite, blefarite, inflamação, edema de córnea, formação de sinéquia, lesões em corpo ciliar e íris podem estar associadas à inflamação secundária a presença do parasita, ao depósito de imunocomplexos nestas áreas, que pode ser corroborado pela presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania* em vários tecidos intraoculares, ou por manifestações sistêmicas da LVC (BRITO *et al.*, 2004; FERRER, 1999; FERRER, 2002; SILVA, 2007).

As lesões intestinais podem estar associadas a reação inflamatória. Pode ser observado diarreia crônica e melena, devido a ulcerações na mucosa gástrica intestinal (CIARAMELLA; CORONA, 2003; FERRER, 1999; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

No rim, glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos está quase sempre presente, podendo estar associado com nefrite tubulointersticial, que pode ser causada secundariamente à patologia glomerular e/ou à inflamação induzida pela deposição de complexos imunes (SARIDOMICHELAKIS, 2009). Essas lesões levam a proteinúria e podem resultar em hipertensão, induzindo à amplificação da patologia glomerular, a síndrome nefrótica e à insuficiência renal crônica, que é a causa mais comum de óbito por LVC (CORTADELLAS *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2003; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Figura 5 – Imagens mostrando outras manifestações clínicas da leishmaniose visceral canina.



(a) queratoconjuntivite purulenta com dermatite periocular; (b) lesões de pele com dermatite exfoliativa multifocal; (c) epistaxe; (d) onicogribose e; (e) ulceração de pele na região da orelha.

Fonte: Baneth *et al.* (2008).

A inflamação do músculo esquelético é bastante comum na doença e se manifesta como atrofia muscular, sendo mais pronunciada nos músculos mastigatórios. As lesões são atribuídas à inflamação granulomatosa devido a presença de amastigotas nos macrófagos, na deposição de imunocomplexos e da produção de autoanticorpos (SARIDOMICHELAKIS, 2009). A LVC também pode manifestar lesões osteolíticas e osteoproliferativas (BURRACO *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2005).

Podem ocorrer hemorragias devido a hiperglobulinemia, que interfere na formação da malha de fibrina, sequestro esplênico de plaquetas, hipoplasia medular e vasculite por deposição de imunocomplexos (LUVIZOTTO; CECÍLIA, 2006). A epistaxe pode ocorrer por conta da trombocitopenia, hiperviscosidade associada à hiperglobulinemia, ulcerações nasais e a vasculite (FERRER, 1999; PETANIDES *et al.*, 2008).

Os cães doentes ainda podem apresentar alterações neurológicas tais como letargia, convulsões, mioclonias, nistagmo, tremores, andar em círculos, tetraparesia e rigidez raquial e cervical. Os sinais neurológicos da LVC estão associados à inflamação meningial crônica com infiltrado linfoplasmocitário (VIÑUELAS *et al.*, 2001). Altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* são encontrados no líquido cerebrospinal tendo origem, provavelmente, da circulação sanguínea através do rompimento da barreira hematoencefálica ocasionado pelas leishmanias (LIMA *et al.*, 2003).

A desordem imunológica pode originar doenças oportunistas concomitantes à LVC como cistites, pneumonias bacterianas, piodermites, malasseziose, dermatofitoses, demodicose e ainda co-infecções com outros agentes, como babesia e dirofilária (LUVIZOTTO; CECÍLIA, 2006).

4 DIAGNÓSTICO

4.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral canina (LVC) é complexo, pois a doença pode apresentar sinais clínicos inespecíficos que são comuns a outras patologias. Há um amplo espectro de sinais, desde animais aparentemente saudáveis, passando por oligossintomáticos, até estágios severos da doença (GONTIJO; MELO, 2004). Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados se apresentam assintomáticos, podendo a doença permanecer inaparente por longos períodos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A apresentação clínica predominante é um processo generalizado, debilitante e crônico de doença sistêmica que afeta os tecidos cutâneos e viscerais (PAPICH, 2009). Os achados principais ao exame físico são febre, lesões cutâneas, ulcerações de pele (especialmente no focinho, orelhas e extremidades), alopecia (localizada ou generalizada), perda de peso progressiva, atrofia muscular, linfadenopatia periférica generalizada, conjuntivite, ceratite, onicogribose, hepatomegalia e esplenomegalia (BANETH *et al.*, 2008; BIANCHI *et al.*, 2016; KOUTINAS *et al.*, 2001). Também pode ser observado vômitos, diarreia, intolerância ao exercício, falta de apetite, poliúria e polidipsia (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado com cães naturalmente infectados no Maranhão no ano de 2008, os sinais clínicos mais frequentes foram onicogribose, descamação furfurácea e úlceras na pele, linfadenomegalia, caquexia e palidez de mucosa oral e conjuntival (ABREU-SILVA *et al.*, 2008).

História clínica pertinente, um exame físico completo e vários testes diagnósticos de rotina, como hemograma completo, perfil bioquímico e urinálise, podem ajudar a elevar o índice de suspeita dessa doença (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). O diagnóstico clínico pode ser feito por esfregaços de aspirados de baço, medula óssea, linfonodos e sangue a fim de verificar a presença do parasita (BIANCHI *et al.*, 2016; GONTIJO; MELO, 2004).

Anormalidades laboratoriais que devem aumentar a suspeita clínica de leishmaniose incluem anemia leve não regenerativa, trombocitopenia, hiperproteïnemia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, azotemia e proteinúria (PAPIC, 2009).

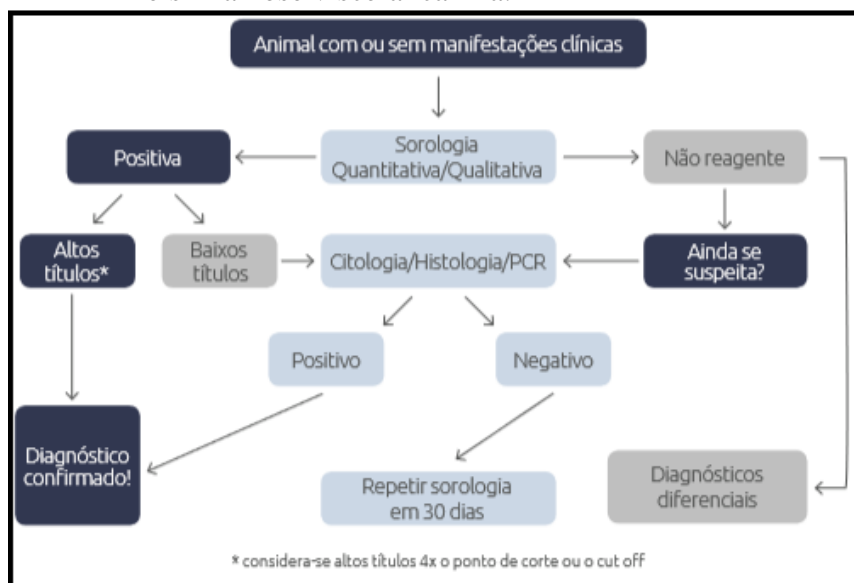
4.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial geralmente é realizado por duas razões principais: para confirmar a doença, a fim de descobrir se um cão com sinais clínicos e/ou anormalidades clinopatológicas compatíveis com LVC realmente tem a doença, e para investigar a presença de infecção para estudos epidemiológicos, principalmente com o objetivo de rastrear cães clinicamente saudáveis vivendo em regiões endêmicas (MIRÓ *et al.*, 2008; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

As características clínicas variam amplamente como consequência dos numerosos mecanismos patogênicos envolvidos no processo da doença e da diversidade das respostas imunes individuais exibidas frente a *Leishmania infantum* por cada hospedeiro, podendo ser muito inespecíficas (SOLBACH; LASKAY, 1999). Por esta razão, e devido à alta taxa de soroprevalência em pacientes caninos subclínicos e assintomáticos em áreas endêmicas (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001), o diagnóstico de LVC é extremamente desafiador. É importante ressaltar que já foi demonstrado que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fonte de infecção para flebotomíneos e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão da *Leishmania* (LAURENTI *et al.*, 2013; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001). Assim, é importante separar a infecção por *Leishmani* da doença propriamente dita e aplicar diferentes técnicas de diagnóstico em conformidade (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

O diagnóstico laboratorial da doença canina é semelhante ao realizado na doença humana, podendo ser baseado em exames sorológicos, parasitológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) ou por técnicas moleculares (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). Para determinar o teste laboratorial a ser utilizado, é importante que se conheça a área provável de transmissão, a base de cada teste diagnóstico, suas limitações e sua interpretação apropriada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). Uma sugestão de fluxograma de diagnóstico pode ser visualizada na figura 6.

Figura 6 – Sugestão de fluxograma de diagnóstico para leishmaniose visceral canina.



Fonte: Virbac (2018).

4.2.1 Diagnóstico sorológico

A LVC é caracterizada por uma marcada estimulação policlonal de linfócitos B, que resulta em hipergamaglobulinemia e grande produção de anticorpos, o que facilita o diagnóstico através de testes sorológicos (GONTIJO; MELO, 2004). O diagnóstico sorológico pode ser feito através da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* séricos específicos (IgG) usando técnicas sorológicas quantitativas, como reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Altos níveis de anticorpos são associados com alto nível de parasitismo e doença (REIS *et al.*, 2006). No entanto, a presença de níveis baixos de anticorpos não é necessariamente uma indicação da doença. Assim, é importante definir títulos de corte para os testes sorológicos, já que um alto nível de anticorpos é conclusivo para o diagnóstico, mas a presença de níveis baixos requer mais estudos para confirmar ou excluir a leishmaniose através de outros métodos diagnósticos, como citologia, histopatologia e PCR (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). Ainda, há alguns cães que permanecem soronegativos por períodos variáveis após a infecção (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004).

Resultados falso-positivos nestes exames por reação cruzada com outros patógenos já foram descritos para testes comumente usados para diagnóstico da doença, especialmente em áreas onde há infecção por *Trypanosoma cruzi* ou outras espécies de *Leishmania* (FERREIRA *et al.*, 2007; PORROZZI *et al.*, 2007)

Atualmente no Brasil, para inquéritos em saúde pública, os exames disponíveis para diagnóstico sorológico são a RIFI (reação de imunofluorescência indireta) e o ELISA (ensaio imunoenzimático), que expressam os níveis de anticorpos circulantes (GONTIJO; MELO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O material recomendado para coleta é o soro sanguíneo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Essas duas técnicas sorológicas são recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários, sendo o ELISA recomendado para triagem de cães sorologicamente negativos e a RIFI para confirmação dos cães sororreagentes ao teste ELISA, ou como uma técnica de diagnóstico na rotina clínica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Os exames sorológicos deverão ser realizados nos laboratórios centrais estaduais (LACENs) ou nos Centros de Controle de Zoonoses municipais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

4.2.1.1 ELISA

O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes no soro com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos são adicionados posteriormente. Se houver a presença de anticorpos específicos no soro, os mesmos vão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado sororreagente é aquele que apresente o valor da densidade ótica igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte do resultado do controle negativo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O teste de ELISA é o mais utilizado para o imunodiagnóstico de leishmaniose visceral. É um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI (GONTIJO; MELO, 2004). A sensibilidade e especificidade do ELISA dependem muito dos antígenos empregados (MIRÓ *et al.*, 2008). Os antígenos utilizados são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitas intactos ou moléculas solúveis. Esses antígenos apresentam reações cruzadas com outras espécies da família *Trypanosomatidae*, e mesmo com microrganismo filogeneticamente distantes

(GONTIJO; MELO, 2004; SUNDAR; RAI, 2002). Portanto, é necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças.

4.2.1.2 RIFI

A RIFI tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico de várias doenças parasitárias, sendo uma de suas principais limitações a possibilidade de apresentar reações cruzadas, principalmente com Leishmaniose Tegumentar Americana e Doença de Chagas, mas também com malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; SUNDAR, 2002). Isso dificulta a interpretação dos dados epidemiológicos, pois no Brasil ocorre superposição da leishmaniose visceral, sobretudo com leishmaniose tegumentar e doença de chagas (GONTIJO; MELO, 2004). Além disso, a RIFI apresenta baixa especificidade (GONTIJO; MELO, 2004). O resultado considerado sororreagente é aquele que possua título igual ou superior ao ponto de corte que é a diluição 1:40 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

4.2.2 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico conclusivo pode ser feito através da observação em microscópio de amastigotas de *Leishmania* em tecidos infectados (MAIA; CAMPINO, 2008). O diagnóstico parasitológico representa um método seguro de diagnóstico, uma vez que o resultado positivo é dado pela observação direta do parasita. A especificidade dos métodos é de aproximadamente 100%, mas a sensibilidade é muito variável, dependendo do grau de parasitemia, tipo de material coletado e porque a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A sensibilidade também pode variar de acordo com tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina, estando em torno de 80% para cães sintomáticos (que tendem a ter uma carga parasitaria maior) e menor ainda para cães assintomáticos (GONTIJO; MELO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Os métodos diagnósticos parasitológicos incluem a detecção do parasito em material biológico obtido através de aspirados de lesões cutâneas, gânglios linfáticos, medula óssea, baço e biópsia ou escarificação de pele (ALVAR *et al*, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SARIDOMICHELAKIS *et al*, 2005). Estes materiais podem ser utilizados para confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório (ALVAR *et al*, 2004; GONTIJO; MELO, 2004).

Menos comumente a citologia é realizada em outros tecidos ou fluidos corporais (DANTAS-TORRES, 2006). A citologia representa uma poderosa ferramenta para o diagnóstico por conta do seu baixo custo, rápida avaliação do resultado a especificidade absoluta (SARIDOMICHELAKIS *et al*, 2005). Os parasitos da *Leishmania* também podem ser visualizados em histopatologia de biópsias de pele ou outros órgãos infectados (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Entretanto, alguns desses procedimentos, embora ofereçam a vantagem da simplicidade, são métodos invasivos, significando a ocorrência de riscos para os animais e também impraticáveis em programas de saúde pública, em que um grande número de animais deva ser avaliado em um curto espaço de tempo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

4.2.3 Diagnóstico molecular

Nos estudos com leishmaniose, o PCR tem sido utilizado com várias finalidades além do diagnóstico, tais como o monitoramento do tratamento e estudos epidemiológicos (GONTIJO; MELO, 2004). Os ensaios de PCR melhoraram significativamente a sensibilidade do diagnóstico parasitológico da infecção por *Leishmania* em cães. A detecção de DNA específico do parasita nos tecidos permite diagnósticos mais seguros, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente (MIRÓ *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). Uma variedade de tecidos, incluindo amostras de sangue, aspirados de medula óssea, baço, linfonodos e biópsia de pele e conjuntiva vêm sendo utilizados para o diagnóstico por PCR (STRAUSS-AYAL *et al.*, 2004), entretanto, a maioria desses métodos é considerado como invasivo, podendo ser de difícil execução e causar desconforto no animal.

Um estudo realizado por Strauss-Ayali *et al.* (2004) revelou que pequenas amostras da conjuntiva de cães naturalmente infectados, obtidas de forma não invasiva (suabes) mostraram-se uma boa fonte para detecção do DNA de *Leishmania*, tendo alta sensibilidade e especificidade. Ainda, que o uso de amostras múltiplas (obtidas em ambos os olhos) aumentou a sensibilidade do exame.

Outro estudo realizado por Manna *et al.* (2004) com base na coleta de amostras de pele, sangue e linfonodo de cães naturalmente infectados e em tratamento, comparou a sensibilidade e confiabilidade da análise por PCR dos diferentes materiais biológicos, mostrando que todos foram positivos para leishmaniose em pelo menos uma das amostras. Ainda, todas as vezes que os cães tiveram uma recaída, o PCR resultou positivo para os três

tipos de amostra. Entretanto, quando os cães estavam aparentemente saudáveis, a análise de PCR foi positiva em amostras de pele e linfonodos, mas nem sempre em amostras de sangue.

O mesmo estudo ainda demonstrou que durante o tratamento dos cães, a terapia promove um decréscimo na carga parasitária no sangue, com subsequente redução dos títulos sorológicos e resultados de PCR negativos. Pelo contrário, o resultado baseado em análise de amostras de pele, bem como de linfonodos aspirados dos mesmos pacientes, continuava revelando resultados positivos indicando, assim, que os animais permanecem infectados, mas clinicamente assintomáticos. Quando os cães recidivam, tanto o título sorológico quanto o PCR voltam a ser positivos em amostras de sangue. Dessa forma, como a terapia promove uma regressão dos linfonodos e sua amostragem é uma técnica invasiva e, por vezes, difícil de ser executada em cães assintomáticos saudáveis, o estudo sugere que a biópsia de pele representa um bom substrato para o diagnóstico e acompanhamento da doença (MANNA *et al.*, 2004).

É importante observar que os dados resultantes do PCR são apenas dois: positivo ou negativo. Também que quando positivo, simplesmente prova que o cão está infectado e não que a infecção esteja causando os sinais clínicos (FRANCINO *et al.*, 2006; SARIDOMICHELAKIS, 2009). No entanto, uma vez que umas das características da leishmaniose é ter parasitas residuais ou latentes após o tratamento, abordagens quantitativas são necessárias não apenas para elucidar o status de cães em áreas endêmicas, mas também no monitoramento da parasitemia no pós-tratamento e no desenvolvimento de novas vacinas ou ensaio com drogas. (FRANCINO *et al.*, 2006).

O PCR quantitativo em tempo real é uma técnica avançada que pode detectar cargas parasitárias extremamente baixas quando comparada ao PCR convencional (FRANCINO *et al.*, 2006; MIRÓ *et al.*, 2008), além de permitir a quantificação e acompanhamento das cargas de *Leishmania* em tecidos de cães infectados, o que é importante tanto para o diagnóstico, bem como para o acompanhamento durante o tratamento da doença, a fim de estimar a eficácia da terapia ou a evolução do quadro (FRANCINO *et al.*, 2006; MANNA *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009;).

Um valor de corte de densidade do parasita pode ser estabelecido para distinguir de uma maneira confiável os cães suscetíveis dos resistentes (FRANCINO, 2006).

5 TRATAMENTO

O tratamento de cães positivos para leishmaniose é controverso devido à falta de quimioterápicos eficazes que resultem em cura parasitária, resultando em animais persistentemente infectados, o que pode representar risco de transmissão para humanos e outros animais (TROY, 2009). O objetivo da terapia é controlar os sinais clínicos e anormalidades clinopatológicas, melhorar a imunidade, evitar recaídas e diminuir a carga parasitária e a competência em transmitir o parasita. As decisões terapêuticas devem seguir uma avaliação da condição clínica do paciente e da gravidade da doença (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014; OLIVA *et al.*, 2010; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009, 2011).

O tratamento da leishmaniose visceral canina deve seguir o estadiamento clínico e geralmente é baseado na administração de parasiticidas por algumas semanas em combinação com parasitostático por longos períodos (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Em locais onde o tratamento com drogas de uso humano é permitido, como nos Estados Unidos e Europa, o protocolo de tratamento é baseado no uso de antimoniais pentavalentes como o Antimoniato de Meglumina e o Estibogluconato de Sódio. O fármaco mais utilizado atualmente é o Antimoniato de Meglumina (Glucantime®), na dose mínima de 100 mg/kg, uma vez ao dia, por via subcutânea, durante três a quatro semanas (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014). Uma grande porcentagem dos animais tratados com este fármaco mostra recuperação clínica, além de redução da carga parasitária nos linfonodos e pele. Como efeitos adversos desse tratamento o cão pode apresentar vômito, diarreia, dor muscular, formação de abscessos, tromboflebite e insuficiência renal (TROY, 2009). Concomitante a estes fármacos, o alopurinol (10-15 mg/kg, por via oral, uma ou duas vezes ao dia, por seis a doze meses) pode ser utilizado como fármaco de manutenção (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). Outros fármacos utilizados são a Anfotericina B, pentamidina e amonossidina (FERRER, 1997; TROY, 2009). Entretanto, nenhum desses têm sido satisfatoriamente efetivo e bastante seguro no cão, podendo causar efeitos colaterais (KOUTINAS *et al.*, 2001).

Um protocolo alternativo de primeira escolha é a administração de miltefosina (hexadecilfosfolina) na dose de 2 mg/kg, via oral, uma vez ao dia por quatro semanas, combinada com alopurinol (10-15 mg/kg, via oral, duas vezes ao dia por pelo menos seis a doze meses).

A miltefosina é um fármaco originalmente desenvolvido como agente antineoplásico, que é capaz de matar parasitas *in vitro* e *in vivo* (FARCA *et al.*, 2012; NOLI, SARIDOMICHELAKIS, 2014) por perturbar as vias de sinalização e síntese da membrana celular, levando à apoptose (VERMA; DEY, 2004). Além disso, a miltefosina é capaz de estimular a atividade de células T e macrófagos e a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio que atuam como parasiticidas (SOTO; TOLEDO, 2007). Quando usado como monoterapia, reduz significativamente a carga parasitária, mas não é capaz de levar a uma cura parasitológica (MANNA *et al.*, 2008). Apesar de alcançar uma boa eficácia clínica quando usado como monoterapia, os animais tratados apresentaram um aumento significativo na carga parasitária 6 meses após o tratamento ter sido descontinuado (ANDRADE *et al.*, 2011; MATEO *et al.*, 2009; WOERLY *et al.*, 2009). A maioria das intervenções terapêuticas de curto prazo geralmente são seguidas por uma recaída dentro de um ano após a interrupção do tratamento (BANETH; SHAW, 2002). Para prevenir a recorrência de LVC, drogas parasitostáticas, como o alopurinol, são geralmente combinadas com terapia leishmanicida (miltefosina, meglumina) com uso contínuo por vários meses ou anos para além da cura clínica (NOLI; AUXULIA, 2005; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014), a fim de diminuir significativamente a taxa de recaída.

Os efeitos colaterais da miltefosina geralmente incluem vômitos (ANDRADE *et al.*, 2011; MATEO *et al.*, 2009; WOERLY *et al.*, 2009). Devido à sua baixa nefrotoxicidade, a miltefosina tem sido recomendada em vez do antimoniato de meglumina para cães com injúria renal, pois é menos provável que cause danos tubulares graves em cães saudáveis, embora sem alterações clínicas ou bioquímicas associadas (BIANCIARDI *et al.*, 2009), além de ser a única droga permitida para o tratamento da leishmaniose visceral canina no Brasil (VIRBAC, 2018).

Devido ao risco de recidiva da doença, se usado sozinho, o curso de 4 semanas de miltefosina é geralmente administrado em conjunto com alopurinol, que é continuado por pelo menos 6-12 meses a mais. A combinação miltefosina-alopurinol foi encontrada ser mais ativa *in vitro* do que a miltefosina utilizada como monoterapia (FARCA *et al.*, 2012), e é clinicamente tão eficaz quanto o protocolo padrão baseado em antimoniato de meglumina e alopurinol (MIRÓ *et al.*, 2009).

Pacientes submetidos a esses protocolos devem ser frequentemente monitorados, especialmente sua função renal, por conta do alto potencial nefrotóxico dos fármacos em animais que já podem apresentar afecção renal por conta da doença. É importante ressaltar

que o tratamento é longo, dispendioso e só parcialmente eficaz, além de exigir comprometimento do tutor.

5.1 Estadiamento

O estadiamento da LVC é a etapa final no processo de diagnóstico. Ele deve fornecer informações clinicamente úteis para decisões terapêuticas e/ou para prognósticos. Na proposta de estadiamento elaborada pelo Grupo LeishVet®, os animais podem ser classificados em 4 estágios clínicos de severidade da doença, baseado em sinais clínicos, achados laboratoriais e sorologia.

No estágio I os cães têm títulos negativos ou muito baixos de anticorpos, sinais clínicos brandos (pápulas na pele e linfadenomegalia) e usualmente não apresentam anormalidades clinicopatológicas. Nesse caso, o prognóstico é bom e é aconselhável o tratamento ou, pelo menos, o uso de inseticidas tópicos ou coleiras impregnadas com eficácia comprovada contra flebotomíneos, já que mesmo os animais soropositivos assintomáticos são competentes em transmitir o parasita (LAURENTI *et al*, 2013).

No estágio II os cães mostram baixos a altos títulos de anticorpos e sinais clínicos mais severos, como lesões cutâneas difusas, anorexia, perda de peso, febre ou epistaxe. Esses animais normalmente apresentam uma variedade de anormalidades clinicopatológicas como anemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, mas apresentam valores de creatinina normais. Para esses cães, o protocolo de miltefosina ou antimoniato de meglumina associados com alopurinol é indicado e o prognóstico é de bom a reservado (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

No estágio III os cães apresentam de médio a altos níveis de anticorpos, sinais clínicos do estágio I e II associados juntamente com sinais de deposição de imunocomplexos nos olhos (uveíte), vasos sanguíneos (vasculite), articulações (poliartrites) e/ou rins (glomerulonefrite). Além das anormalidades clinicopatológicas listadas no estágio II, os cães apresentam doença renal crônica (DRC) estágio I ou II, de acordo com os valores de creatinina. A terapia para estes animais é baseada em miltefosina/meglumina associada com alopurinol, assim como suporte à doença renal, sendo o diagnóstico de reservado à ruim (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

No estágio IV, os cães também apresentam médios a altos níveis de anticorpos e, em conjunto com os sinais clínicos descritos em outros estágios, podem apresentar tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótica e DRC estágio III ou IV. Estes cães têm um

prognóstico ruim e devem ser tratados apenas com alopurinol e terapia de suporte à doença renal (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Hemograma, perfil bioquímico, proteínas séricas e urinálise completa devem ser monitorados no final do primeiro mês de tratamento, a cada 3 a 4 meses até a completa recuperação e depois a cada 6 a 12 meses (ROURA *et al.*, 2013; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001). A avaliação do título de anticorpos deve ser monitorada a partir dos 6 meses, sendo que um aumento de mais de duas vezes nos títulos deve ser considerado sugestivo de uma recaída (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009, 2011). Como alternativa, uma diminuição da carga parasitária avaliada por PCR em tempo real poderia ser útil na avaliação do sucesso do tratamento e monitoramento da evolução da doença (ROURA *et al.*, 2013), sendo que um aumento poderia sugerir uma recaída (MANNA *et al.*, 2008).

5.2 Fármacos de manutenção

O alopurinol é um fármaco parasitostático, que atua inibindo a produção de purina pela *Leishmania*; quando incorporado pelo amastigota intracelular, transforma-se em um componente tóxico que mata o parasita (OLIVA *et al.*, 2010). Nos protocolos terapêuticos, o alopurinol pode ser descontinuado somente quando todas as seguintes condições forem atendidas: recuperação clínica completa; normalizaçãoclinicopatológica; níveis de anticorpos negativos ou abaixo do nível de corte do teste (MARTÍNEZ *et al.*, 2011; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009, 2011). Nem todo cão tratado é capaz de atingir esse status, permitindo que o tratamento com alopurinol seja interrompido (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Apesar da eficácia do alopurinol quando associado a outros fármacos, por causa da grande variabilidade de resultados em diferentes estudos clínicos, não há evidência suficiente para recomendar o seu uso como monoterapia. Seu uso como monoterapia tem sido defendido no tratamento de pacientes no estágio I ou IV da doença (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011), por não ser uma droga nefrotóxica assim como as outras empregadas no tratamento, ou em locais onde outros fármacos não têm seu uso liberado (NOLI; AUXILIA, 2005; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Em um estudo realizado por Koutinas *et al.* (2001), cães submetidos a tratamento unicamente com alopurinol tiveram redução significativa da densidade do parasita nos gânglios linfáticos e medula óssea, assim como redução significativa dos títulos com testes sorológicos. Alguns animais após o tratamento foram negativados nos testes sorológicos, porém continuaram apresentando PCR da medula óssea positivo. Também apresentaram

decréscimo na densidade de parasitas presentes em linfonodos, indicando a morte do parasito ou que seu potencial de multiplicação reduziu consideravelmente. Ainda, a severidade dos sinais clínicos reduziu significativamente.

É recomendado o uso do alopurinol por pelo menos seis a doze meses após o final do tratamento com drogas parasiticidas (OLIVA *et al.*, 2010; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; TORRES *et al.*, 2016). Um efeito adverso importante do uso da droga é a formação de cálculos de xantina, devendo os cães em tratamento com alopurinol serem monitorados constantemente (TORRES *et al.*, 2016).

5.3 Imunoestimulantes

A domperidona é um medicamento pró-cinético e antiemético gástrico que age como um antagonista do receptor de dopamina D2 capaz de estimular a produção de serotonina, que por sua vez aumenta a secreção de prolactina (BERCZI; BERTÓK; CHOW, 2000). A prolactina, além de seu papel bem conhecido na produção de leite, é uma importante citocina pró-inflamatória derivada de linfócitos e é capaz de estimular respostas imunes induzidas por linfócitos e a ativação de macrófagos e células Natural Killer (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Em estudo realizado por Gómez-Ochoa *et al.* (2009), domperidona foi administrada duas vezes por dia por via oral, na dosagem de 1 mg/kg por um mês para cães naturalmente infectados com gravidade variável da doença. A domperidona foi efetiva na redução de sinais clínicos e anticorpos na maioria dos animais tratados.

6 PREVENÇÃO E CONTROLE

O controle da doença no Brasil, orientado pelo Ministério da Saúde, tem sido realizado pela adoção de quatro estratégias: (1) diagnóstico precoce e tratamento de casos humanos; (2) redução da população de flebotomíneos, através da aplicação de inseticida nos domicílios situados em área endêmica; (3) eutanásia de cães soropositivos; (4) atividades de educação em saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Teoricamente, as estratégias de controle parecem adequadas, mas na prática a prevenção de doenças transmissíveis por vetores biológicos é bastante difícil pelo fato da existência de reservatório silvestres além dos domésticos e aos aspectos ambientais (GONTIJO; MELO, 2004). Dessa forma, essas medidas têm se mostrado pouco efetivas para conter a disseminação da doença no país.

Apesar dos esforços, a leishmaniose visceral tem aumentado significativamente sua importância no contexto epidemiológico em decorrência do processo de urbanização e das alterações no ambiente natural (BEVILACQUA *et al.*, 2001). A epidemiologia e distribuição de doenças transmitidas por vetores podem ser afetadas por mudanças na ecologia de vetores e movimentação das populações humana e canina (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012). O crescimento desordenado das cidades com alto fluxo populacional, em conjunto com a degradação do meio ambiente e adaptação das espécies vetorais, associado aos baixos níveis socioeconômicos, tem sido apontado como promotor das condições para ocorrência da leishmaniose visceral na área urbana (COURA, 2005; DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Um estudo realizado em seis municípios brasileiros, entre os anos de 2012 e 2013, através de entrevistas com gestores municipais de programas de controle de leishmaniose visceral, analisou insuficiências e dificuldades encontradas para a execução de medidas de controle da doença propostas pelo Ministério da Saúde. Todos os coordenadores entrevistados relataram dificuldades na execução do trabalho de campo preconizado pelo Ministério da Saúde pela complexidade do controle da doença, sendo que as principais dificuldades apontadas foram: (1) recusa da população, pelo impedimento da entrada de técnicos nas residências para controle químico e para controle do reservatório canino; (2) eutanásia como a principal medida indicada ao reservatório doméstico, havendo grande resistência por parte dos tutores dos animais, bem como da comunidade; (3) custo elevado do programa, sendo relatado que os recursos advindos do Ministério da Saúde são muitas vezes insuficientes, de forma que há descontinuidade de atividades por falta de recursos materiais, financeiros e humanos. A interrupção das atividades e/ou a sua realização parcial fragiliza o programa de controle da

doença, uma vez que nenhuma das ações isoladamente é capaz de prevenir e controlar o agravo em sua totalidade, podendo ser uma das explicações para o avanço territorial da doença e aumento de morbidade e letalidades da leishmaniose visceral (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

6.1 Controle do vetor

O emprego de inseticidas e medidas de saneamento do meio doméstico para a redução da densidade do vetor são medidas cautelares, previstas no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Medidas como limpeza urbana, eliminação e destino adequado de resíduos sólidos orgânicos e eliminação de fontes de umidade, podem auxiliar na redução da proliferação do vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O controle do vetor tem sido baseado no uso de inseticida direcionado para as formas adultas, uma vez que os criadouros da espécie são pouco conhecidos (GONTIJO; MELO, 2004). O controle químico é feito por meio da utilização de inseticidas de ação residual e deve ser realizado em áreas endêmicas no período do ano em que se verifica o aumento da densidade vetorial (quando a curva de sazonalidade do vetor for conhecida), ou ao final do período chuvoso, com um segundo ciclo de aplicação três a quatro meses após o primeiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O inseticida deve ser aplicado nas paredes internas e externas dos domicílios, nos abrigos de animais e anexos. Os produtos mais empregados atualmente são piretróides, como cipermetrina e deltametrina, tendo ação residual média de três meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O controle vetorial, segundo o Ministério da Saúde, difere de acordo com o estrato epidemiológico do município. Naqueles somente com transmissão canina ou em áreas classificadas como de transmissão esporádica da doença, não é preconizado o controle químico. Assim, para os municípios somente com transmissão canina as medidas de controle vetorial são baseadas em ações de manejo ambiental que visam reduzir condições favoráveis para o estabelecimento de criadouros do vetor (presença de matéria orgânica e de locais sombreados) (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

Porém, a forte relação apresentada pela ocorrência de leishmaniose visceral e os perfis cultural, nutricional e socioeconômicos da população atingida, remetem a questão do controle para além das barreiras pertencentes ao contexto ambiental em que a doença está inserida (BORGES *et al.*, 2008).

6.2 Controle na população canina

Devido à importância do cão como reservatório da leishmaniose visceral, o Ministério da Saúde adota no Brasil a eliminação destes animais quando são soropositivos e/ou apresentam exame parasitológico positivo para *L. infantum* como medida de controle em áreas endêmicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Embora preconizada no Brasil, os resultados da eutanásia canina são controversos. Além de controversa do ponto de vista científico, a eutanásia como medida de saúde pública tem pouca eficácia pela rejeição desta atividade por parte da comunidade (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016). A eutanásia animal é tema regido pela Resolução número 1.000, de onze de maio de 2012, na qual consta que “a eutanásia deve ser indicada quando o bem-estar animal estiver ameaçado e também quando o animal constitui-se ameaça à saúde pública”, dando margem tanto para a defesa da vida animal quanto para respaldar a ação da saúde pública (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

No estudo realizado por Zuben e Donalísio (2016), os motivos citados pelos entrevistados para recusa da população à eutanásia canina foram: afeto pelo animal; animais reagentes, porém sem sintomatologia; interferência de clínico veterinário particular; interferência de ONG's protetoras de animais; descrédito no programa; exames laboratoriais pouco confiáveis; e desconhecimento sobre o risco de transmissão animal para o humano.

A limitada acurácia dos métodos diagnósticos utilizados na população canina pode ser um fator limitante para a efetividade da eutanásia como medida de controle da doença. Exames sorológicos podem gerar tanto resultados falso positivos, como falso negativos (podendo manter cães infectantes na comunidade) (COURA-VITAL *et al.*, 2014). Outro fator considerado como possível razão para a pouca efetividade da eutanásia como medida de controle, foi a demora entre o resultado reagente e a eutanásia, mantendo cães potencialmente transmissores da doença na comunidade (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

Além disso, estudos apontam que pessoas que perderam seus cães eutanasiados tendem a adquirir novos cães posteriormente. A renovação torna a população canina mais jovem e as implicações epidemiológicas desse fato incluem maior suscetibilidade a diferentes doenças, maior prolificidade e baixa resposta imunológica (ANDRADE *et al.*, 2007; ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

Outras medidas de prevenção da leishmaniose nos cães são o controle da população canina errante, doação de animais somente após o exame para leishmaniose negativo, uso de telas do tipo malha fina em canis individuais ou coletivos, para evitar a entrada de

flebotomíneos, e uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Também existem produtos spot-on a base de permetrina com ação repelente.

O uso de coleiras caninas impregnada com deltametrina 4% tem demonstrado bons resultados. As coleiras, além de evitarem a picada do flebotomíneo, aumentam a mortalidade desses insetos, reduzindo a circulação de *L. infantum* em locais onde o cão é o principal reservatório do parasita, sendo uma estratégia de prevenção simples e de fácil aceitação pela população quando comparada à eliminação de cães infectados (GONTIJO; MELO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

6.2.1 Vacinas

Prevenção e controle mais eficazes poderiam ser alcançados com o uso da imunoprofilaxia dos cães. Atualmente no Brasil, há no mercado apenas uma vacina contra a leishmaniose visceral canina licenciada pelo MAPA, a Leish-Tec®. O produto destina-se a cães saudáveis, acima de 4 meses de idade, devendo-se aplicar 3 doses, por via subcutânea, com intervalo de 21 dias entre as doses e reforço anual. Para o reforço, deve-se contar um ano a partir da primeira dose da vacina. Somente cães com sorologia negativa devem ser vacinados. (HERMONT, 2008). A vacina compreende o antígeno recombinante A2, associado ao adjuvante saponina. O antígeno A2 é uma proteína expressa em formas amastigotas de *L. donovani* (REGINA-SILVA *et al.*, 2016). A vacinação dos cães é capaz de induzir uma forte resposta celular protetiva contra antígenos específicos da *Leishmania*, com uma efetiva resposta imune alcançada aproximadamente 3 semanas após o final do protocolo vacinal (PALATNIK-DE-SOUZA, 2012; SILVA, 2013).

Sabe-se que a resistência à doença está associada à ativação da resposta Th1 mediada por células CD4+ e CD8+ com a produção de interferon-gama. Observa-se também aumento nos níveis de IgG2 específicos em cães assintomáticos ou resistentes à infecção (SILVA, 2013). No entanto, a resposta humoral (Th2) não é considerada competente em conferir resistência à infecção. Em cães suscetíveis à infecção, a ativação da resposta Th2 leva a expansão e proliferação de células B e produção de interleucinas (IL-4, IL-6 e IL-10), sendo responsável pelo aumento dos níveis séricos de imunoglobulinas, contribuindo para a formação de imunocomplexos que não conferem efeito protetor (SILVA, 2013).

Um estudo conduzido em Minas Gerais, em área endêmica para leishmaniose visceral, entre os anos de 2008 e 2010 objetivou estimar a eficácia desta vacina. No estudo, animais imunizados com Leish-Tec® apresentaram níveis de anticorpos IgG2 anti-rA2

significativamente maiores do que o grupo controle (não imunizados), indicando a indução de resposta Th1 (REGINA-SILVA *et al.*, 2016). Em animais vacinados, anticorpos IgG2 têm sido associados a opsonização e fixação do complemento que podem promover eliminação de amastigotas extracelulares e inibição da sua infectividade, o que contribui para a resistência induzida pela vacinação (BOURDOISEAU *et al.*, 2009). Houve uma redução significativa do número de casos de leishmaniose visceral no grupo vacinado em comparação ao grupo controle (não imunizado). Ainda, o xenodiagnóstico detectou uma redução de aproximadamente 46% da transmissão para flebotomíneos nos cães vacinados apresentando sorologia positiva para anticorpos anti-rA2. Concluindo, assim, que a vacina é efetiva para profilaxia da LVC (REGINA-SILVA *et al.*, 2016). Outro estudo demonstrou que 98% dos cães vacinados com Leish-Tec® apresentaram altos níveis de anticorpos anti-rA2 (TESTASICCA *et al.*, 2014). A vacina, ainda, por promover o estímulo predominante da resposta celular, e por utilizar um antígeno proveniente de amastigotas (e não de promastigotas como os utilizados usados em testes sorológicos de rotina), não induz soroconversão após a vacinação nos testes sorológicos de rotina, um requerimento importante frente ao fato da eutanásia de cães soropositivos ser recomendada (HERMONT, 2008; TESTASICCA *et al.*, 2014).

A vacinação pode ser adotada concomitantemente com outras medidas atuais de controle e reduzir as taxas de transmissão, especialmente se as vacinas não induzirem soroconversão em testes diagnósticos (TESTASICCA, *et al.*, 2014). No entanto, o Ministério da Saúde ainda não recomenda o uso da vacinação de cães em Saúde Pública, pois os estudos realizados referem-se apenas a eficácia vacinal e não ao impacto da vacinação canina na incidência da doença humana (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

6.3 Educação em saúde

As ações de educação em saúde têm caráter informativo e visam esclarecer sobre as formas de prevenção e controle da doença, estimulando a posse responsável de animais e medidas de manejo ambiental (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016). Estas atividades devem estar inseridas em todos os serviços que desenvolvem as ações de controle da leishmaniose visceral, requerendo o envolvimento de múltiplos profissionais. São realizadas ações de divulgação à população sobre a ocorrência da doença, sinais clínicos e serviços para diagnóstico e tratamento, capacitação de equipes e desenvolvimento de atividades de educação em saúde junto à comunidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

7 CONCLUSÃO

A epidemiologia da leishmaniose envolve a interação entre os parasitas de *Leishmania*, mosquitos flebotomíneos e hospedeiros suscetíveis. A crescente domesticação do ciclo de transmissão tem provocado mudanças na epidemiologia da doença. Antes considerada como sendo uma doença de áreas rurais, hoje se encontra presente em grandes centros urbanos, sendo endêmica em todas as regiões do país e tendo grande importância em saúde pública.

Cães que apresentam a doença manifestam sinais clínicos que podem ser muito inespecíficos e comuns a outras patologias, tornando o diagnóstico um desafio para os médicos veterinários. O diagnóstico correto e precoce é essencial para instituição do tratamento, melhorando o prognóstico do paciente e diminuindo a possibilidade de transmissão do parasita de animais infectados aos vetores. O controle dos reservatórios, principalmente os cães, preconizado pelo Ministério da Saúde, tem sido eticamente rejeitado, principalmente devido ao seu baixo impacto na incidência de leishmaniose humana. No Brasil, o tratamento de cães com drogas de uso humano não é permitido, mas recentemente o fármaco Milteforan® foi liberado pelo MAPA para tratamento de cães no país, sendo uma alternativa à eutanásia. O tratamento dos cães não é uma medida recomendada pelo Ministério da Saúde por não levar a cura parasitológica, não diminuindo a sua importância como reservatório do parasito. O uso de coleiras impregnadas com deltametrina e vacinação podem ser utilizados como medidas profiláticas individuais.

Devido à complexidade que existe nos diversos fatores de controle da doença, há a necessidade de compreensão das interações entre mudanças no meio ambiente urbano e o vetor para desenvolvimento de ações apropriadas de controle, com instituição de medidas de controle integrado e planejamento unificado com participação de profissionais de diversas áreas para, assim, escolher o melhor conjunto de ações a serem adotadas.

REFERÊNCIAS

- ABREU-SILVA, A. L. *et al.* Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 197-203, set. 2008.
- ALVAR, Jorge *et al.* Canine leishmaniasis. **Advances in parasitology**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 1-88, 2004.
- ANDRADE, Andréa Maria *et al.* Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, p. 594-595, 2007.
- ANDRADE, H.m. *et al.* Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 2-4, p.83-90, set. 2011.
- BANETH, Gad; SHAW, Susan E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 106, n. 4, p. 315-324, 2002.
- BANETH, Gad *et al.* Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 324-330, July 2008.
- BANULS, Anne-Laure; HIDE, Mallorie; PRUGNOLLE, Franck. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in parasitology**, London, v. 64, p. 1-458, 2007.
- BECK, Ana *et al.* A case of visceral leishmaniosis in a gray wolf (*Canis lupus*) from Croatia. **Journal of wildlife diseases**, Ames, Iowa, v. 44, n. 2, p. 451-456, Apr. 2008.
- BERCZI, Istvan; BERTÓK, LÓrÁnd; CHOW, Donna A. Natural immunity and neuroimmune host defense. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 917, n. 1, p. 248-257, Jan. 2000.
- BEVILACQUA, P. D. *et al.* Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.] v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001.
- BIANCHI, Matheus Viezzer *et al.* Leishmaniose Visceral Canina autóctone na região urbana de Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 44, p. 1-4, 2016.
- BIANCIARDI, Paolo *et al.* Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys. **Toxicologic pathology**, Newark, v. 37, n. 6, p. 770-775, Oct. 2009.
- BOGGIATTO, Paola Mercedes *et al.* Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 5, n. 4, p. e1019, Apr. 2011.

BORGES, Bárbara Kellen Antunes *et al.* Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [S.l.] v. 24, p. 777-784, 2008.

BOURDOISEAU, G. *et al.* Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 71-78, Mar. 2009.

BRITO, Fábio Luiz da Cunha *et al.* Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from the Olinda city, Pernambuco, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 925-929, May/June 2004.

BURACCO, P. *et al.* Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. **Journal of small animal practice**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 29-30, Jan. 1997.

CHAPPUIS, François *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature reviews microbiology**, London, v. 5, n. 11supp, p. S7, nov. 2007.

CIARAMELLA, Paolo; CORONA, Marco. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on continuing education for the practising veterinarian-north american edition-**, [S.l.], v. 25, n. 5, p. 358-369, May 2003.

COELHO, Willian Marinho Dourado *et al.* Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 4, p. 256-258, Oct./Dec. 2010.

CORTADELLAS, Oscar *et al.* Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. **Journal of veterinary internal medicine**, Philadelphia v. 20, n. 4, p. 941-947, June 2006.

COSTA, Carlos HN *et al.* Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [S.l.], v. 66, n. 4, p. 334-337, 2002.

COSTA, L. B. *et al.* Ocorrência de flebotômíneos vetores da leishmaniose visceral nos municípios do Estado de Mato Grosso. **Rev Abrasco**, [S.l.], v. 8, p. 639, 2003.

COURA, José Rodrigues. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro, v. 2, p. 450- 473, 2005.

COURA-VITAL, Wendel *et al.* Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e91009, Mar. 2014.

DANTAS-TORRES, Filipe. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 117-118, fev. 2006.

DANTAS-TORRES, Filipe. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, nov. 2007.

DANTAS-TORRES, Filipe. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. S1, mar. 2009.

DANTAS-TORRES, Filipe *et al.* Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 531-538, dec. 2012.

ELSHEIKHA, Hany. Leishmaniosis in dogs and cats. **The Veterinary Nurse**, v. 7, n. 5, p. 260-267, 2016.

FARCA, Anna Maria *et al.* Canine leishmaniosis: in vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. **Parasitology research**, Berlin, v. 110, n. 6, p. 2509-2513, June 2012.

FEITOSA, M.M. *et al.* Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, [S.l.], Ano 5, n.28, p.36-44, 2000.

FERREIRA, Eduardo De Castro *et al.* Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 146, n. 3-4, p. 235-241, may 2007.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: **International Canine Leishmaniasis Forum**, [S.l.], p. 6-10, 1999.

FERRER, L. Leishmaniasis: update in diagnosis and therapy. In: **Proceedings of the Fourteenth Annual Congress of the European Society of Veterinary Dermatology**, [S.l.], p. 33-36, 1997.

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

FIGUEIREDO, Fabiano B. *et al.* Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.l.], v. 40, n. 1, 2012.

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, Apr. 2006.

FREITAS, Eloisa *et al.* Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, apr. 2006.

GIUNCHETTI, Rodolfo Cordeiro *et al.* Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p. 23-33, Jan. 2008.

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

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo v. 7, p. 338-349, 2004.

HERMONT, V. J. Leish-Tec. Vacina Recombinante contra Leishmaniose Visceral Canina. Manual Técnico.1 ed., 2008.

KOUTINAS, Alexander F. *et al.* A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 98, n. 4, p. 247-261, 2001.

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

KRAUSPENHAR, C. *et al.* Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 907-910, maio 2007.

LAINSON R., SHAW J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: The leishmaniasis in biology and medicine, Academic Press, London, p.1-120, 1987.

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

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

LIMA, V. M. F. *et al.* Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 485-489, Apr. 2003.

LIMA, Wanderson Geraldo *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta tropica**, Basel, v. 92, n. 1, p. 43-53, Sep. 2004.

LINHARES, Guido Fontgalland Coelho *et al.* Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, [S.l.], v. 34, n. 1, 2005.

LUVIZOTTO, M. C. R.; CECÍLIA, Maria. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. **Anais do 1o. Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina**, 2006.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 158, n. 4, p. 274-287, Dec. 2008.

MANNA, Laura *et al.* Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, July 2004.

MANNA, Laura *et al.* Leishmania DNA Quantification by Real- time PCR in Naturally Infected Dogs Treated with Miltefosine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, n. 1, p. 358-360, Dec. 2008.

MAROLI, Michele *et al.* Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, Apr. 2007.

MARTÍNEZ, Verónica *et al.* Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. **Parasites & vectors**, London, v. 4, n. 1, p. 57, Apr. 2011.

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

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Ed) **Parasitologia humana**. 11^o ed., Ed. Atheneu, p. 56-72, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**, 2014.

MIRO, Guadalupe *et al.* Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 371-377, Aug. 2008.

MIRÓ, Guadalupe *et al.* Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. **Veterinary dermatology**, Oxford, v. 20, n. 5- 6, p. 397-404, Oct. 2009.

NAUCKE, Torsten J.; LORENTZ, Susanne. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & vectors**, London, v. 5, n. 1, p. 67, Apr. 2012.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary dermatology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 213-232, 2005.

NOLI, Chiara; SARIDOMICHELAKIS, Manolis N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **The Veterinary Journal**, London, v. 202, n. 3, p. 425-435, Dec. 2014.

OLIVA, Gaetano *et al.* Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [S.l.] v. 236, n. 11, p. 1192-1198, Jun. 2010.

PALATNIK-DE-SOUZA, C. B. *et al.* Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 65, n. 5, p. 510-517, nov. 2001.

PALATNIK-DE-SOUZA, Clarisa B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, [S.l.], v. 3, p. 69, 2012.

PAPICH, M. G. Manual Saunders Terapêutico Veterinário, 2a edição. São Paulo: MedVet, 2009.

PENNISI, Maria Grazia. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution**, Sevilla, p. 39-48, 2002.

PETANIDES, T. A. *et al.* Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Journal of veterinary internal medicine**, Philadelphia, v. 22, n. 4, p. 866-872, jul. 2008.

PORROZZI, Renato *et al.* Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and vaccine immunology**, [S.l.] v. 14, n. 5, p. 544-548, 2007.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, London, v. 136, n. 14, p. 1915-1934, Dec. 2009.

RANGEL, Elizabeth F.; VILELA, Maurício L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, dez. 2008.

REGINA-SILVA, Shara *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**, Amsterdam, v. 34, n. 19, p. 2233-2239, Apr. 2016.

REIS, A. B. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in veterinary science**, [S.l.], v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

RESENDE, Marcelo Carvalho de *et al.* Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, state of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 1, p. 51-55, jan. 2006.

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

SARAIVA, Lara *et al.* Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored

locations as determined by spatial analysis. **Acta Tropica**, [S.l.], v. 117, n. 2, p. 137-145, Feb. 2011.

SARIDOMICHELAKIS, Manolis N. *et al.* Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 73, n. 1, p. 82-86, July 2005.

SARIDOMICHELAKIS, Manolis N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 20, n. 5- 6, p. 471-489, Oct. 2009.

SHARMA, Umakant *et al.* **Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control.** *J Vector Borne Dis*, [S.l.] v. 45, n. 4, p. 255-72, Dec.2008.

SHERLOCK, I. A. Nota sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Bras. Malariol**, [S.l.], v. 16, p. 19-26, 1964.

SILVA, Francinaldo S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Rev Trop Cienc Agr Biol**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SILVA, Kathlenn Liezbeth Oliveira *et al.* Vacinas Contra Leishmaniose: Uma Revisão. **Archives of health investigation**, [S.l.], v. 2, n. 4, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 39, n. 2, p. 560-563, Feb. 2001.

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

SOLANO-GALLEGO, Laia *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & vectors**, London, v. 4, n. 1, p. 86, May 2011.

SOLBACH, Werner; LASKAY, Tamás. The host response to *Leishmania* infection. In: **Advances in immunology**, [S.l.], Academic Press, p. 275-317, 1999.

SOTO, Jaime; TOLEDO, Julia T. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, New York, v. 7, n. 1, p. 7, Jan. 2007.

SOUZA, AI de *et al.* Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul state, Brazil: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 15, n. 2, p. 359-365, 2009.

SOUZA, Alda Izabel *et al.* Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 129, n. 1-2, p. 51-54, Apr. 2005.

STRAUSS-AYALI, Dalit *et al.* Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 189, n. 9, p. 1729-1733, May 2004.

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

TAFURI, Wagner L. *et al.* Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 203-212, Apr. 2001.

TESTASICCA, M. C. S. *et al.* Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 204, n. 3-4, p. 169-176, Aug. 2014.

TORRES, M. *et al.* Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, [S.l.], v. 57, n. 6, p. 299-304, 2016.

TROY, G. C. American Leishmaniasis. In: BONAGURA; TWEDT. *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*. St. Louis: Saunders Elsevier, 2009.

VERMA, Navin K.; DEY, Chinmoy S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, Aug. 2004.

VIÑUELAS, J. *et al.* Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amstedam, v. 101, n. 1, p. 23-27, Oct. 2001.

VIRBAC. Manual Técnico Milteforan. Disponível em: <https://br.virbac.com/files/live/sites/br-public/files/contributed/PDFs/AF_FOLDER_VET_DIGITAL.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2018.

WHO. World Health Organization. Control of leishmaniasis. *In: SIXTIETH WORLD HEALTH ASSEMBLY*.12.3, A60/10, 2007.

WOERLY, Virginie *et al.* Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitology research**, Berlim, v. 105, n. 2, p. 463, Aug. 2009.

YOUNG, David G.; DURAN, Margo A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Walter reed army inst of research washington dc**, Washington 1994.

ZUBEN, Andrea Paula Bruno von; DONALÍSIO, Maria Rita. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, [S.l.], v. 32, p. e00087415, 2016.