

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O MANEJO TERAPÊUTICO DE  
INTERVENÇÃO NA LEISHMANIOSE CANINA: DEFINIÇÃO DE UM  
MODELO DE RESPOSTA PREDITIVA AO TRATAMENTO E EFEITO  
CLÍNICO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ADJUVANTES  
NUTRICIONAIS**

**RAFAELA DE SOUSA GONÇALVES**

Salvador - BA  
2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O MANEJO TERAPÊUTICO DE  
INTERVENÇÃO NA LEISHMANIOSE CANINA: DEFINIÇÃO DE UM  
MODELO DE RESPOSTA PREDITIVA AO TRATAMENTO E EFEITO  
CLÍNICO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ADJUVANTES  
NUTRICIONAIS**

**RAFAELA DE SOUSA GONÇALVES**

Médica Veterinária

Salvador - BA  
2020

**RAFAELA DE SOUSA GONÇALVES**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O MANEJO TERAPÊUTICO DE  
INTERVENÇÃO NA LEISHMANIOSE CANINA: DEFINIÇÃO DE UM  
MODELO DE RESPOSTA PREDITIVA AO TRATAMENTO E EFEITO  
CLÍNICO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ADJUVANTES NUTRICIONAIS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Stella Maria Barrouin Melo

Coorientadores: Profa. Dra. Daniela Farias Larangeira  
Prof. Dr. Ricardo Jorge Leal Silvestre

**SALVADOR-BA  
2020**

Dados internacionais de catalogação-na-publicação  
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Gonçalves, Rafaela de Sousa.

Contribuição para o manejo terapêutico de intervenção na leishmaniose canina: definição de um modelo de resposta preditiva ao tratamento e efeito clínico da suplementação com adjuvantes nutricionais / Rafaela de Sousa Gonçalves. - 2020.

147 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Stella Maria Barrouin Melo.

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Farias Larangeira.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Jorge Leal Silvestre.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2020.

1. Medicina Veterinária. 2. Zoonoses. 3. Doenças transmissíveis em animais. 4. Cães - Doenças. 5. Leishmaniose. 6. Antioxidantes. 7. Vitaminas na nutrição animal. I. Melo, Stella Maria Barrouin. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.08969364

CDU - 636.7:616.993.161

**CONTRIBUIÇÃO PARA O MANEJO TERAPÊUTICO DE  
INTERVENÇÃO NA LEISHMANIOSE CANINA: DEFINIÇÃO DE UM  
MODELO DE RESPOSTA PREDITIVA AO TRATAMENTO E EFEITO  
CLÍNICO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ADJUVANTES NUTRICIONAIS**

Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal nos Trópicos.

Salvador, em 22 de outubro de 2020

Comissão Examinadora:



*Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela*  
(Presidente da Banca – Instituto de Ciências da Saúde – UFBA)

*Profª Dra. Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho*  
(Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais)

*Profª Dra. Cristiane Divan Baldani*  
(Instituto de Veterinária - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro)

*Profª Dra. Francine Johansson Azeredo*  
(Faculdade de Farmácia – UFBA)

*Profª. Dra. Veridiana Fernandes da Silveira*  
(Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB)



*Prof. Dr. Luís Fernando Pita Gondim*  
Coordenador do Programa

## AGRADECIMENTOS

Começo essa extensa lista de agradecimentos, a minha orientadora, professora Stella Barrouin, pela confiança em mim depositada para a execução desse projeto envolvendo os queridos nutracêuticos. Sem você não haveria metodologia e muito menos essa orientanda que vos fala. Agradeço toda amizade, orientação, ensinamentos, condução, acolhimento durante todos esses anos. Eu não poderia ter tido orientadora melhor. Obrigada!

A minha coorientadora, prof. Daniela Larangeira, por todo auxílio na clínica, sempre me salvando em todos os casos simples e “pepinados”. “É caso pepinado? Joga pra Dani que ela resolve!” Agradeço sua parceria e disponibilidade. À prof. Flaviane Alves por toda disponibilidade, e saiba, que é bonito te ver trabalhando ao nosso lado na bancada em busca do nosso crescimento profissional. Agradeço ao prof. Franke por ser meu eterno orientador e um exemplo de profissional e pessoa para mim.

Ao meu coorientador, Dr. Ricardo Silvestre por todo auxílio laboratorial. Sempre externei aos colegas a minha admiração e sorte por ter tido, neste percurso, um coorientador da sua magnitude. Obrigada por todo auxílio em Portugal e fora dele.

As minhas crias acadêmicas que tenho muito orgulho de ter semeado a plantinha da pesquisa e ter construído uma amizade para toda a vida. Fico muito feliz e tenho muita sorte de ter tido vocês como braço direito e esquerdo durante todo o meu doutorado, meus PIBICs inteligentes, dinâmicos e competentes: Mariana Mendes (rainha do laboratório) e Tiago Andrade (rei da clínica). Não sei o que faria sem vocês. Eu chegaria ao final? Talvez, porém faltando, com certeza, alguns dos meus membros e um pouco da minha sanidade. Obrigada por tudo.

Aos meus lindos e inteligentes estudantes também do Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE), por todo o auxílio laboratorial e clínico: Mayro Rafaga (rei do mel, competentíssimo), Cosme Nogueira (menino-gênio que vocês ainda vão ouvir muito falar), Thamires Luz (fada maravilhosa e prestativa), Catharina Farias (uma das pessoas mais fortes que eu já conheci – apesar de ela ainda não saber disso), Leo Pacheco (o que tem de prestativo, tem de querido), Gabizinha (linda e super inteligente). Agradeço desde às risadas proporcionadas nos corredores do LIVE e HOSPMEV aos árduos trabalhos laboratoriais, incluindo a maquinaria humana para embalagem dos soros e plasmas pra Portugal (rs) – agradeço também aos estudantes “catados” por Cosme para compor a tropa embalativa. Vou levar vocês para sempre, meus meninos!

Aos meus queridos pós-graduandos (ou seria pós-graduados?) que foram cruciais para que eu chegasse até aqui: Gabi Porfírio, que mesmo de longe estava sempre disponível para o que eu precisasse. Uma das pessoas que me ensinou o pouco que eu sei de clínica com muita doçura e paciência. Rose Chagas, uma das pessoas mais resilientes que eu já conheci, e não digo isso da boca para fora, pelo modismo da palavra. Admiro muito sua competência e agradeço sua amizade. Clauceane Jesus, guerreira, e que apesar de libriana, sabe bem o que quer. A Laiane Bulhosa, pela amizade e parceria durante todo esse tempo, me socorria na clínica com maestria sempre que eu precisava. Obrigada, meninas (incluindo Mari Mendes) por estarem comigo quando isso tudo aqui era mato (rs). Paloma, rainha da nutrição animal, sempre disposta a passar o conhecimento que sabe. Agradeço a Bruno e Natasha Varjão por todo o suporte com as amostras enviadas à USP e

todo cuidado. Agradeço também a Narinha Santos e a Vitor Magalhães (Vitão - para ele não estranhar) por essa amizade construída agora no finalzinho do percurso para fechar com chave de ouro esse meu pote repleto de amor que foi o LIVE.

O LIVE me trouxe diversas pessoas sensacionais, e uma delas é Marina Rossi. Inicialmente técnica e patologista clínica veterinária do LIVE para um dos meus melhores presentes da vida. Muito obrigada, minha Mari, pela amizade e toda a grandíssima ajuda laboratorial e teórica partilhada com maestria. Obrigada por chegar e permanecer.

Saindo do Brasil e atravessando o Atlântico, agradeço as queridas Joana Barbosa e Juliana Faria. Quando cheguei a Portugal, mais precisamente ao laboratório, vi alguns reagentes com a seguinte denominação em sua embalagem “JJ”. E quando eu percebi, já estava misturada entre essa dupla JJ nos corredores da Cespu e nas ruas de Guimarães. Agradeço imensamente toda disponibilidade ao responder a uma simples dúvida, na preparação de reagentes na bancada, aos ensinamentos sobre mexer nos aparelhos, realizar ensaios científicos, na realização de contas matemáticas e gráficos, além disso, me ensinaram os quão prestativos, inteligentes e maravilhosos são os portugueses. Vocês deixaram meu coração quentinho quando eu estava longe de casa. Agradeço também a Joana Gaifem, menina de ouro, por todo auxílio na Uminho, além de Inês e Carolina. Obrigada, meninas.

Ao prof. Ricardo Dinis, pelos ensinamentos, prestatividade, simpatia e auxílio laboratorial. Peço desculpas, pois sobrecarreguei o seu aparelho com centenas de amostras de soro e este ficou na limpeza por dois dias (rs). Obrigada de coração por tudo. Agradeço ao prof. Luis Cardoso (LeishVet) pelo suporte e atenção fornecidos a mim em Portugal. Muito honrada em ter tido a oportunidade de conhecer esses dois profissionais admirados nas suas áreas: de medicina forense que é o prof. Dinis, e na área da leishmaniose canina que é o prof. Luis. Agradeço demais à CESPU pela atividade desenvolvida.

Ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC-UFBA) pela parceria com a realização de exames, esclarecimento de dúvidas e fornecimento de descontos nos exames de patologia clínica realizados periodicamente, proporcionando um custo mais acessível aos tutores com a mesma qualidade. Agradeço sempre ao suporte de vocês: Íris Menezes, Ludmila Moroz, Juliana Albuquerque, Mateus Cedro, Karol Barreto, Lucas Paz e a toda equipe de técnicos. Obrigada!

Aos meus pais Edna e Edison, ao meu tio Edisio, minha prima Ísis, meus cães, gatos (em especial ao meu Bran *in memoriam*) e aos meus familiares e amigos que diretamente ou indiretamente tornaram isso possível com muito amor, estrutura, risadas e afeto.

Ao Hospital de Medicina Veterinária da UFBA (HOSPMEV-UFBA) e toda a sua equipe de funcionários (e ex-funcionários): Silvinho, Marília, Sena, Deise, Ludmilla, Júnior, Bruno, Fernanda, Maise, Zaíra, Demerval e tantos outros. Ao CMPA (Júlia Liger, Elisangela, Ana Rosa, Evandro), e todos os ex-residentes de todos os setores (incluindo CMPA, CCPA, Patologia, Patologia Clínica, Anestesiologia, Reprodução). Ao setor de Ultrassonografia - em especial a Jenice e à prof. Catarina por todo o suporte ultrassonográfico). À equipe de Oftalmologia que sempre nos ajudou grandemente. À equipe de Nutrição Animal. Aos membros da Cirurgia Veterinária-CCPA pela parceria na castração dos pacientes. À equipe da Farmácia. A todos os queridos do HOSPMEV-UFBA que passaram pelo nosso caminho e pelo nosso Ambulatório de

Leishmanioses Zoonóticas (ALZ-UFBA) fornecendo muita ajuda e ensinamento. Agradeço também à prof. Manuela Solcà pelo auxílio na área estatística.

À equipe de Dra. Hiro na Universidade de São Paulo (USP), pelo suporte laboratorial.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro (Código de Financiamento 001) e concessão da bolsa de estudos brasileira e do PDSE-Sanduíche (Processo: 88881.189587/2018-01).

Aos servidores do PPGCAT-UFBA por toda atenção disponibilizada desde o princípio, incluindo Emanuel (Guga), Angélica, Kátia e Rodrigo. Agradeço aos coordenadores do Programa profa. Alessandra Estrela e prof. Luis Fernando Pita.

Aos responsáveis pelos cães do projeto, parceiros nessa jornada árdua, que muitas vezes vinham de regiões longínquas no interior do Estado ao Hospital, mas o caminho se estreitava diante do amor e comprometimento que tinham ao seu animal. Alguns deles tornaram-se amigos e juntos traçamos os melhores caminhos diante do que nos era permitido, sempre com muito respeito e atenção (de ambas as partes). Agradeço imensamente a: minha querida Aurea Caribé, Josemary, dona Magna, Marília e Felipe, família Carvalho (seu Antônio e dona Consuelo), Milena, Jéssica e José, Lilian e dona Zene, dona Marluce, a Iago, Jaqueline Bulhosa, Márcio e Patrícia, seu Robério e dona Maristela, dona Tereza, Willimeire, Marcela e d. Angela, a Fábio Reis, ao seu Cláudio Sousa e dona Fátima, a Joseane Santos, a Fernanda e d. Célia, a d. Vera e Simonia, a Cajuhi, a seu Manuel Munoz, Wagner Bacelar, d. Hilda, Emanuelle, a Mateus Lobão, a Paulo Santos, a Rafaela e d. Célia Pedrosa e ao seu Carlos Ruy, Talita e Mailson, Catharine e família, Thereza Gabriela, Vinícius e família, Lindimar. Agradeço pelo comprometimento e admiro-os pela força, pois não é fácil ter um cão com leishmaniose no Brasil.

E por fim, agradeço aos meus queridos pacientes caninos que fizeram esse projeto tomar corpo, aos que responderam efetivamente ao tratamento e aos que não responderam. Costumo dizer que todo mundo precisa passar pelo amor que é atender e ver a evolução de cães tão dóceis e amáveis quanto esses: Frida, Narim e Apolo, Léo, Trovão e Chayene, Billy Carvalho, Nina's, Fred's, Tuca, Kate, Zuza, Samira, Alefe, Lilica, Narim, Thor, Mel, Buck, Toddy, Sophie, Hannah, Koko, Laika, Dunko, Tieta, Sansão, Bolt, Spike, Gita, Meg, Og, Bruce, Marley, Safira, Lobinho, Pretinho, Nicole, Nick, Ayra, Dom, Duquesa, Yndi, Kiara, Tobias, Dudu e todos os outros. A vocês, onde quer que estejam, meu muito obrigada.

GONÇALVES, R. S. **Contribuição para o manejo terapêutico de intervenção na leishmaniose canina: definição de um modelo de resposta preditiva ao tratamento e efeito clínico da suplementação com adjuvantes nutricionais.** 2020. 147p. Tese (Doutora em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2020.

## RESUMO

A leishmaniose canina (LCan) é uma doença zoonótica causada, no Brasil, pelo protozoário intracelular *Leishmania infantum*. O cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório doméstico do parasito, além de ser uma espécie susceptível ao desenvolvimento de formas graves e fatais da doença. O curso da LCan é caracterizado por alterações consideráveis no metabolismo imunológico e oxidativo, e uma resposta benéfica ou não ao tratamento dependerá de fatores diversos como a sensibilidade do protozoário ao fármaco antiparasitário aplicado ou a patogenicidade inerente à estirpe de *L. infantum* causadora da doença, assim como a qualidade da resposta do hospedeiro canino à infecção. Para contribuir para o conhecimento de aspectos inerentes à resposta do hospedeiro canino, o presente estudo propôs: 1) identificar possíveis biomarcadores preditivos de uma resposta terapêutica eficaz em cães com LCan; e 2) avaliar se a associação de adjuvantes nutricionais com propriedades antioxidantes a fármacos com ação anti-*Leishmania* seria capaz de promover melhora de parâmetros clínicos-laboratoriais e de interferir no perfil de alguns biomarcadores de estresse oxidativo de cães com LCan e assim no desfecho terapêutico. Cães com infecção confirmada foram divididos em dois grupos: respondedores ao tratamento (que apresentaram redução da carga parasitária de *L. infantum* por qPCR; n=12) e não-respondedores (que não apresentaram redução da carga parasitária; n=14). Os cães foram monitorados por meio de exame clínico, hematológico e bioquímica sérica aos 30 dias, dois, três, seis e doze meses pós-tratamento. Foi desenvolvido um modelo matemático para estimar o sucesso do tratamento anti-*Leishmania*. Os eritrócitos e o fósforo sérico foram identificados como marcadores preditivos precoces da resposta terapêutica na LCan. Os dados obtidos nesse estudo indicam que cães que responderam ao tratamento apresentaram um perfil laboratorial que diferiu precocemente dos cães que não responderam. Para o segundo objetivo, os cães com infecção confirmada em diferentes estágios clínicos foram aleatoriamente agrupados, segundo o critério terapêutico, em outros dois grupos: G1 (cães que utilizaram adjuvantes nutricionais antes e durante a terapia quimioterápica anti-*Leishmania*; n=6) e G2 (cães que utilizaram apenas fármacos anti-*Leishmania* prévios; n=12) para avaliação comparativa. Os adjuvantes nutricionais incluíram nutracêuticos comerciais à

base de óleo de peixe (rico em ácidos graxos DHA e EPA – ômega 3) e vitaminas do complexo B. Os dados mostraram que cães que receberam suplementos apresentaram indicadores de controle da inflamação, com redução de globulinas totais, imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania*, redução das proteínas totais e da proteína C reativa, além de aumento de albumina sérica. Os adjuvantes nutricionais influenciaram positivamente na resposta de cães ao tratamento para LCan; assim, nossos dados encorajam o seu uso na rotina e o aprofundamento de investigações sobre a utilização de antioxidantes veiculados sob a forma de nutracêuticos e vitaminas orais como uma estratégia co-terapêutica no tratamento da doença.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, Estresse oxidativo, Preditores, Tratamento, Vitaminas

## ABSTRACT

Canine leishmaniasis (CanL) is a zoonotic disease caused by the intracellular protozoan *Leishmania infantum* in Brazil. The dog (*Canis familiaris*) is considered the main domestic reservoir of the parasite, in addition to being a species susceptible to the development of serious and fatal forms of the disease. The course of CanL is characterized by changes in immune and oxidative metabolism, and an effective response to treatment will depend on several factors such as the sensitivity of the protozoan to the antiparasitic drug, the inherent pathogenicity of the strain of *L. infantum* involved and the quality of the immune response developed by the canine host. Aiming to contribute to the knowledge about inherent aspects to the response of the canine host, this study proposed: 1) to identify possible predictive biomarkers of an effective therapeutic response in dogs with CanL; and 2) to evaluate whether the association of nutritional adjuvants with antioxidant properties and anti-*Leishmania* drugs would be able to promote improvement of clinical and laboratory parameters, alter some of the biomarkers of oxidative stress in dogs with CanL, and thus the outcome of the treatment. Dogs with confirmed infection were divided into two groups: treatment responders (who showed a reduction in the *L. infantum* parasitic load by qPCR; n = 12) and non-responders (who did not show a reduction in the parasite load; n = 14). The dogs were monitored by clinical, hematological and serum biochemical evaluation at 30 days, two, three, six and twelve months after treatment. A mathematical model has been developed to estimate the success of anti-*Leishmania* treatment. Erythrocytes and serum phosphorus were identified as early predictive markers of therapeutic response in CanL. Data obtained in this study indicate that dogs that responded to treatment showed an early difference in their profile of laboratory parameters when compared to dogs that did not respond to treatment. For the second objective, dogs with confirmed infection at different clinical stages were randomly grouped, according to the therapeutic criterion into two other groups: G1 (dogs that used nutritional adjuvants before and during anti-*Leishmania* chemotherapy; n = 6) and G2 (dogs that used only previous anti-*Leishmania* drugs; n = 12) for comparative evaluation. Nutritional adjuvants included commercial nutraceuticals based on fish oil (rich in DHA and EPA fatty acids - omega 3) and complex B vitamins. The data showed that dogs that received supplements exhibited indicators of inflammation control, with a reduction in: total globulins, specific anti-*Leishmania* immunoglobulins, total proteins and C-reactive protein, in addition to an increase in serum albumin. Nutritional adjuvants positively influenced the response of dogs to treatment for CanL. Thus, our data encourage the use of nutritional adjuvants in clinical routine as well as the development of further studies on the use

of antioxidants in the form of nutraceuticals and oral vitamins as a co-therapeutic strategy in the treatment of the disease.

**Keyword:** Antioxidants, Oxidative stress, Biomarkers, Treatment, Vitamins

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

- Figura 1 - Cães respondedores exibem menor carga parasitária e melhoram o estadiamento clínico 42
- Figura 2 - Cães respondedores exibem a assinatura Th1. 43
- Figura 3 - O sucesso da terapia anti-*Leishmania* está associado a uma restauração dos eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, bem como os valores totais e específicos de globulina da *Leishmania*. 45
- Figura 4 - Cães que não respondem desenvolvem lesões hepáticas e renais subclínicas 48
- Figura 5 - Desenvolvimento de um modelo matemático com valor preditivo para o sucesso da quimioterapia da LCan, incluindo a medição dos parâmetros eritrocitários e do fósforo. 49

### Capítulo II

- Figura 1 - Desenho experimental do estudo sobre tratamento e acompanhamento durante 12 meses de cães com leishmaniose canina adquirida naturalmente (LCan). 79
- Figura 2 - Fotografias de cães com leishmaniose canina naturalmente infectada (LCan) antes e após tratamento com adjuvantes nutricionais (NAs) administrados precocemente (G1) ou tardiamente(G2) 84
- Figura 3 - Melhoria dos marcadores inflamatórios em cães aos quais foram administrados adjuvantes nutricionais (NAs) precoces (G1) ou tardios (G2) no curso do tratamento para leishmaniose canina naturalmente adquirida (LCan). 85

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1 -	Valores hematológicos, bioquímicos séricos, parâmetros de estresse oxidativo e carga parasitária dos tempos inicial e final dos cães respondedores e não respondedores ao tratamento.	47
------------	---	----

### Capítulo II

Tabela suplementar 1 -	Composição e quantidade de cada substância que compunha os adjuvantes nutricionais (nutracêuticos ômega 3 e vitaminas do complexo B) consumidos juntamente aos fármacos anti- <i>Leishmania</i> , metronidazol e cetoconazol, e o alopurinol, pelos cães tratados com LCan e monitorados durante 12 meses.	85
Tabela suplementar 2 -	Valores dos parâmetros hematológicos, bioquímicos, de estresse oxidativo e de carga parasitária dos cães portadores de leishmaniose canina naturalmente adquirida submetidos ao tratamento com os fármacos metronidazol, cetoconazol e alopurinol e adjuvantes nutricionais PUFA ômega 3 e vitaminas do complexo B.	86
Tabela suplementar 3 -	Dados individuais de 18 cães do estudo que receberam adjuvantes nutricionais (NAs) precocemente (G1=6, do n.1 ao n.6) ou tardiamente (G2=12, do n.7 ao n.18) no curso de protocolos de tratamento para leishmaniose canina naturalmente adquirida (LCan) causada por <i>Leishmania infantum</i> incluindo medicamentos anti- <i>Leishmania</i> (ALDs) metronidazol e cetoconazol, seguidos do leishmaniostático alopurinol, e monitorados durante 12 meses.	90

## LISTA DE SIGLAS

A/G razão	Razão entre albumina e globulina
AHCC	Composto Ativo Correlacionado com Hexose (do inglês <i>Active Hexose Correlated Compound</i> )
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina (do inglês <i>Adenosine triphosphate</i> )
BID	Duas vezes ao dia (do latim <i>bis in die</i> )
Ca	Cálcio
CP	Carga parasitária
CK	Creatina quinase
CK-MB	Creatina quinase MB
cPCR	Reação em Cadeia da Polimerase convencional
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
CAT	Catalase
CT	Ciclo <i>Threshold</i>
DHA	Ácido decosaheptaenoico (do inglês <i>Docosahexaenoic acid</i> )
DPP	Plataforma de Caminho Duplo (do inglês <i>Dual Path Platform</i> )
ELISA	Ensaio Imunoenzimático por Adsorção a Placa (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
EPA	Ácido eicosapentaenoico (do inglês <i>Eicosapentaenoic acid</i> )
EROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>Reactive oxygen species</i> )
FA	Fosfatase alcalina
G1	Grupo de cães que recebeu adjuvantes nutricionais previamente mais fármacos anti- <i>Leishmania</i>
G2	Grupo de cães que recebeu apenas fármacos anti- <i>Leishmania</i> com inserção dos adjuvantes nutricionais só tardiamente
GGT	$\gamma$ -glutamilttransferase
GSH	Glutathiona
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês <i>High Density Lipoprotein</i> )
IFN $\gamma$	Interferon-Gama
IFN- $\alpha$	Interferon-Alfa
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1

IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
kDNA	DNA do cinetoplasto
LCan	Leishmaniose canina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i> )
LV	Leishmaniose visceral
MDA	Malondialdeído
Mg	Magnésio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
P	Fósforo
PD-1	Proteínas de morte programada 1 (do inglês <i>programmed death 1</i> )
P-MAPA	(do inglês <i>Proteic-Magnesium Ammonium Phospholinoleate Anhydride</i> )
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (ou em tempo real)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SID	Uma vez ao dia (do latim <i>semel in die</i> )
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> )
TGFβ	Fator transformador do crescimento-beta (do inglês <i>Transformer Growth Factor – beta</i> )
T <sub>H1</sub>	Células auxiliares – 1 (do inglês <i>T helper 1</i> )
T <sub>H2</sub>	Células auxiliares – 2 (do inglês <i>T helper 2</i> )
T <sub>H17</sub>	Células auxiliares – 17 (do inglês <i>T helper 17</i> )
TR DPP®	Teste Imunocromatográfico Rápido de Plataforma de Duplo Percurso
UA	Unidades arbitrárias
UPC	Razão de creatinina e proteína urinária
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i> )

## SUMÁRIO

		<b>Página</b>
	<b>Resumo</b>	8
	<b>Abstract</b>	10
1.	<b>Introdução</b>	18
2.	<b>Revisão de Literatura</b>	21
2.1.1	Aspectos epidemiológicos e zoonóticos das leishmanioses humana e canina causadas por <i>Leishmania infantum</i>	21
2.2	Transmissão e hospedeiros caninos	22
2.2.	A suspeita clínica e o diagnóstico da leishmaniose canina por <i>L. infantum</i>	23
2.2.1	Apresentação clínica segundo a fisiopatologia	23
2.2.2	Patologia clínica	25
2.2.3	Diagnóstico da infecção	26
2.3	Biomarcadores preditivos, de prognóstico e de monitoramento de tratamento	27
2.4	Biomarcadores de estresse oxidativo no diagnóstico de doenças inflamatórias crônicas e na LCan	28
2.5	Tratamento da LCan	30
2.5.1	Fármacos antiparasitários	30
2.5.2	Fármacos anti-inflamatórios	32
2.5.3	Fármacos e substâncias adjuvantes	33
2.5.3.1	Imunoestimuladores	33
2.5.3.2	Suplementos nutricionais	33
3	<b>Objetivos</b>	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	<b>Hipótese</b>	35
	<b>Capítulo I - Modelo matemático usando biomarcadores preditivos na leishmaniose canina após quimioterapia</b>	36
	Resumo	36
	Introdução	37
	Material e métodos	38
	Resultados	42
	Discussão	49

	Referências do capítulo I	52
	Manuscrito referente ao Capítulo I publicado na <i>Microorganisms</i>	60
	<b>Capítulo II – Adjuvantes nutricionais com propriedades antioxidantes no tratamento da leishmaniose canina</b>	75
	Resumo	75
	Introdução	75
	Material e Métodos	77
	Resultados	82
	Discussão	95
	Conclusão	99
	Referências do capítulo II	99
	Manuscrito referente ao Capítulo II publicado na <i>Veterinary Parasitology</i>	108
5.	<b>Considerações finais</b>	116
	<b>Referências</b>	117
6	<b>Apêndice 1</b> - Figuras suplementares do Capítulo I	132
	Apêndice 2 – Aprovação do estudo na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) n. 19/2011	135
	Apêndice 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido	136
	<b>Produtos Gerados - Produção científica relacionada à tese</b>	137
	Artigo 1 “ <a href="https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113204">https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113204</a> ”	137
	Resumo IV no Congresso Internacional da Associação Portuguesa de Ciências Forenses (em Porto-Portugal)	138
	Resumo 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical	139
	Resumos 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical	140
	Resumos Congresso UFBA 2019	143
	Resumos Congresso UFBA 2018	145

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças zoonóticas vetoriais causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae) transmitidos por insetos flebotomíneos. As principais ocorrências da enfermidade acontecem em países menos desenvolvidos e em populações desprovidas de atenção estatal (WHO, 2019). Mais de 20 espécies de *Leishmania* são infecciosas para humanos, e causam formas clínicas de leishmaniose que têm sido classificadas como distintas e associadas à espécie em questão. A forma visceral é a forma mais grave da doença, que pode culminar com morte, se o paciente não for tratado – tendo como agente etiológico *Leishmania infantum*, nas Américas. A forma tegumentar é comumente observada, causada, no Brasil, por *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, e pode caracterizar-se por lesões dermatológicas, ou desenvolver-se para uma forma mais grave, a mucocutânea, considerada incapacitante e desfigurante (WHO, 2019). Diferentemente da espécie humana, a classificação das leishmanioses na espécie canina não segue essa distinção bem definida, sendo designado na literatura recente como leishmaniose canina, naquelas afecções por *L. infantum*, nas quais lesões tegumentares e lesões viscerais frequentemente desenvolvem-se de modo simultâneo.

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é uma espécie susceptível à infecção por *L. infantum*, em geral desenvolvendo diversos sinais clínicos e anormalidades em exames de patologia clínica, culminando em desfechos potencialmente fatais (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Entretanto, estudos têm mostrado que alguns cães, podem manter uma infecção subclínica associada a um perfil imunológico caracterizado por citocinas que conferem resistência ao desenvolvimento de altas cargas parasitárias e doença (PINELLI et al., 1994; MANNA et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Cães clinicamente doentes apresentam maiores cargas parasitárias e tendem a ser mais infecciosos ao vetor flebotomíneo do que cães com infecção subclínica em áreas endêmicas (TRAVI et al., 2001; MANNA et al., 2006; ALVES et al., 2009; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016; NERY et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2019).

Já se demonstrou que o tratamento de cães com fármacos anti-*Leishmania* promove uma redução da carga parasitária, minimizando as chances de cães tratados serem infecciosos para os vetores em áreas endêmicas (RIBEIRO et al., 2008; DA SILVA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2019). Um estudo do nosso grupo utilizando metronidazol e cetoconazol, fármacos anti-*Leishmania* de segunda linha conforme a literatura (CIARAMELLA, 2003; NOLI; AUXILIA, 2005; PENNISI et al., 2005), mostrou que cães tratados apresentaram redução das cargas parasitárias, determinada por qPCR, aliada a redução na transmissão de *Leishmania* a

flebotômicos em exames xenodiagnósticos (NERY et al., 2017). As diretrizes e consensos para a abordagem clínica da leishmaniose canina (LCan) publicados por pesquisadores veterinários de regiões endêmicas para *L. infantum* sugerem que o tratamento de cães só seja realizado naqueles que apresentam doença clínica, e não naqueles com infecção subclínica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013; MIRÓ et al., 2017). Cães com LCan devem ser tratados por longos períodos e monitorados sistematicamente por médico veterinário, pois mesmo com o uso de quimioterápicos leishmanicidas considerados de primeira escolha, como os antimoniais, os cães tratados podem apresentar recidivas (MANNA et al., 2015). A qualidade da resposta ao tratamento mostra que os cães mais susceptíveis tendem a não responder satisfatoriamente ao tratamento antiparasitário e a apresentar recidiva do quadro clínico mais precocemente do que cães mais resistentes. Dessa forma, o monitoramento para a manutenção de um tratamento efetivo da LCan além de diminuir a frequência de doença clínica, promove maior sobrevida associada à qualidade de vida, e pode reduzir a disponibilidade de hospedeiros com alta carga parasitária aos vetores, o que contribui para o controle do aspecto reservatório do cão na área endêmica (MIRÓ et al., 2011).

Alguns biomarcadores de prognóstico já são conhecidos e mencionados na literatura científica como linfopenia, hiperproteinemia, hipoalbuminemia associada à proteinúria, o que reflete em dano glomerular e pior prognóstico (PALTRINIERI et al., 2016; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018). A redução de marcadores como as globulinas, proteína C reativa, haptoglobina e proteinúria indica resposta clínica satisfatória ao tratamento canino e podem ser usados para monitoramento clínico (MAIA; CAMPINO, 2018; SASANELLI et al., 2007).

Nas últimas décadas, a concepção de que alimentos e nutrientes ricos em elementos essenciais às funções orgânicas podem ser usados de forma terapêutica vem crescendo cientificamente, e deu origem ao termo *Imunonutrição* (BARROUIN-MELO et al., 2016; SILVESTRE; TORRADO, 2018). Imunonutrição consiste no efeito benéfico do nutriente na modulação da atividade do sistema imunológico do organismo (CALDER, 2003) e implica campos de investigação científica como a nutracêutica e a dietética (CORZO et al., 2020). Embora a nutracêutica ainda seja incipiente na clínica veterinária de cães, estudos vêm sendo publicados, e investigações envolvendo aspectos metabólicos das doenças infecciosas e inflamatórias em cães têm crescido (HAGEN et al., 2019), sendo necessárias ferramentas para avaliar a resposta canina nesse campo. A resposta imuno-inflamatória do hospedeiro canino à presença de parasitos *Leishmania* produz estresse oxidativo nas células (ALMEIDA et al., 2013; HEIDARPOUR et al., 2012). Quanto mais crônica e mais caracterizada por patologias teciduais é a resposta, maior é o desequilíbrio nos sistemas antioxidantes/oxidantes, resultando

na elevação da exposição orgânica a radicais livres e sobrecarregando o sistema protetor intrínseco (BARBOSA et al., 2010). A consequência metabólica a ser devidamente diagnosticada e caracterizada é uma redução nos parâmetros antioxidantes e aumento nos níveis de oxidantes totais. A elevação de elementos oxidantes é associada a dano ou morte celular com perda da sua função biológica e/ou desequilíbrio homeostático, envolvido na origem e desenvolvimento de doenças (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Cães portadores de LCan, mesmo aqueles que respondem bem à terapêutica instituída e desenvolvem uma imunidade predominantemente celular, sofrem um significativo dano oxidativo (PALTRINIERI, 2013).

Nosso objetivo foi baseado na ideia de que diante da necessidade de sustentar o sistema imunológico e minimizar o dano causado por compostos oxidantes gerados no combate orquestrado pelas defesas do organismo ao protozoário, uma suplementação nutricional antioxidante seria benéfica quando adicionada ao tratamento antiparasitário de cães com LCan naturalmente adquirida. Assim, investigamos se suplementação com lipídeos ômega 3 e vitaminas do complexo B, associada ao tratamento quimioterápico com cetoconazol e metronidazol, poderia se traduzir em modificações metabólicas que pudessem ser associadas a melhora do quadro clínico e laboratorial desses cães. Durante um ano, os cães foram monitorados a fim de avaliar os parâmetros hematológicos, bioquímicos, metabólicos de estresse oxidativo e carga parasitária, objetivando detectar biomarcadores de resposta clínica, estadiamento e prognóstico ao tratamento.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos epidemiológicos e zoonóticos das leishmanioses humana e canina causadas por *Leishmania infantum*

A leishmaniose visceral (LV) humana é uma doença endêmica, presente em 98 países distribuídos nos cinco continentes (WHO, 2019). Apesar da ocorrência mundial, cerca de 94% dos casos reportados se concentram em apenas sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2019). Bangladesh, país localizado no sul asiático, que fazia parte da lista de países com maiores números de LV, fez progressos significativos para eliminação da enfermidade e obteve sucesso na redução do número de casos (FITZPATRICK et al., 2017; WHO, 2019). Estima-se que 700.000 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose humana ocorram no mundo, com cerca de 26.000 a 65.000 mortes a cada ano (WHO, 2019).

Na América Latina, 55.530 casos humanos de LV foram relatados entre 2001 a 2016, com média de 3.456 por ano, sendo o Brasil detentor de 95% do número de casos (WHO, 2019). Apesar dos números oficiais de casos registrados, os dados da incidência podem não refletir a realidade, devido à subnotificação aos órgãos competentes (MARCONDES e DAY, 2019). Segundo dados do Sistema Nacional de Agravos e Notificação (SINAN), o Nordeste do Brasil é uma das regiões mais densamente acometidas pela LV, sendo endêmica no estado da Bahia e presente em 174 dos 417 municípios baianos (SINAN/DIVEP, 2018). Os municípios de Irecê, seguido por Feira de Santana e Barreiras notificaram o maior número de casos na Bahia no ano de 2017 (SINAN/ DIVEP, 2018).

A LV possui dois padrões epidemiológicos: (1) zoonótica, em que animais são envolvidos como hospedeiros reservatórios no ciclo de transmissão; e (2) antroponótica, quando o homem é a única fonte de infecção para o vetor (DESJEUX, 2004). O primeiro ocorre nas Américas e Europa, tendo como principal agente *L. infantum* e o cão como principal reservatório nas áreas urbanas. O segundo ocorre principalmente na Índia e é causado por *L. donovani* (DESJEUX, 2004).

A expansão da LV, sobretudo nas cidades, vem tomando notoriedade e se consolidando nas áreas urbanas (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). As alterações antrópicas sobre o meio ambiente, com destruição de ecossistemas e modificação de ambientes naturais; a globalização e a urbanização associada à migração de pessoas e seus animais de áreas endêmicas para não endêmicas; pobreza e falta de saneamento; medidas efetivas de controle de vetores ineficazes; e adaptação do vetor flebotomíneo ao peridomicílio são alguns dos fatores associados à

expansão da doença para áreas antes não acometidas (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; MARCONDES; DAY, 2019; NORMAN et al., 2020).

No Brasil, os cães são considerados os principais reservatórios do protozoário em áreas urbanas (ASHFORD, 1996; WERNECK, 2014). Dessa forma, durante muito tempo, o tratamento de cães foi proibido e a eliminação de cães soropositivos vinha sendo a principal medida de controle governamental para reduzir os números de casos humanos de LV (BRASIL, 1963). Entretanto, estudos em diversas regiões do Brasil foram demonstrando que a eliminação de cães não promoveu o resultado esperado ao longo dos anos dessa prática (PARANHOS-SILVA et al., 1998; COSTA, 2011; DANTAS-TORRES et al., 2019). As normas brasileiras limitaram-se a proibir à medicina veterinária o uso de antimoniais e outros fármacos utilizados em protocolos terapêuticos humanos, com a justificativa de evitar o desenvolvimento de cepas resistentes em cães tratados (BRASIL, 2008). Mais recentemente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprovou o uso de miltefosina para tratar a LCan, por meio da Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS (BRASIL, 2016).

Nesse contexto, estudos em diversos países, incluindo o Brasil, vêm mostrando que o tratamento reduz a infecciosidade de cães aos flebotomíneos e promove uma redução da carga parasitária no cão tratado (RIBEIRO et al., 2008; DA SILVA et al., 2012; NERY et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2019). Assim, autores têm argumentado que o tratamento eficaz pode tornar-se uma ferramenta para controlar a propagação da infecção a outros animais e humanos não-infectados, e portanto, auxiliar no controle epidemiológico da infecção por *L. infantum* (TRAVI et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2019).

### **2.1.1. Transmissão e hospedeiros caninos**

Os protozoários digenéticos *Leishmania* necessitam de dois hospedeiros para completarem seu ciclo de vida: o vetor flebotomíneo, inseto que transmite as formas infectantes, e o mamífero, que alberga formas amastigotas parasitárias intra e extracelulares. Nem todos os flebotomíneos envolvidos no ciclo de transmissão estão infectados e aptos a infectarem o hospedeiro. Apenas 1% (podendo variar de 0,5-3%) dos flebotomíneos albergam a forma flagelada do parasito, e apesar de baixo, esse número já é o suficiente para a manutenção da infecção em áreas endêmicas (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). A transmissão via vetor tem uma maior importância epidemiológica, porém outras formas de transmissão são relatadas, a exemplo da transmissão vertical (LATROFA et al., 2016), venérea e transmissão sanguínea (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A infecção por *L. infantum* em cães geralmente cursa com progressão ativa da doença com a manifestação de sinais clínicos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Entretanto, os cães podem ser classificados como resistentes, ou seja, estão infectados, porém estão clinicamente saudáveis, devido eficiência de sua resposta imunológica ao parasito, ou classificados como cães susceptíveis, com apresentação de doença clínica, pois desenvolvem uma resposta imunológica com intensa produção citocinas que estimulam a produção de anticorpos ineficazes no controle do parasito (PINELLI et al., 1994; MANNA et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

## **2.2. A suspeita clínica e o diagnóstico da leishmaniose canina por *L. infantum***

### **2.2.1 Apresentação clínica segundo a fisiopatologia**

A susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento de sinais clínicos na LCan está diretamente relacionada ao tipo de resposta imunológica do hospedeiro infectado (PINELLI et al., 1994; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Cães que respondem predominantemente com o tipo celular TH2, com produção elevada de IL-4 e IL-13, citocinas que estimulam a resposta humoral com intensa produção de imunoglobulinas, tendem a apresentar alta carga parasitária e desenvolver a forma grave da doença (BANETH et al., 2008; CARRILLO; MORENO, 2009). Algumas alterações clínicas predominantes no curso da LCan estão intimamente ligadas à deposição de imunocomplexos, resultante da estimulação imunológica predominantemente humoral (PARODY et al., 2019). Nos cães com infecção ativa, essa deposição de imunocomplexos na pele resulta em dermatites e vasculites; nos rins, glomerulonefrite; na úvea ocular, uveíte; nas articulações, artrite (SOLANO-GALLEGO et al., 2009, 2011). Diferentemente, nos cães que respondem com predominância de citocinas que induzem um resposta do tipo celular, como a IL-12, ocorre ativação de células TCD4+ TH1 com produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , estimulando macrófagos a destruírem os parasitos intracelulares (BANETH et al., 2008; CARRILLO; MORENO, 2009). Dessa maneira, esses cães apresentam baixa carga parasitária associada a um perfil de resistência ao desenvolvimento de doença clínica (PINELLI et al., 1994; MANNA et al., 2006).

Outros conjuntos celulares e citocinas têm sido estudados na leishmaniose, na busca de compreender e ampliar o conhecimento sobre a imunopatogenia na infecção por *Leishmania* no cão. Verificou-se, recentemente, que o aumento da expressão simultânea das citocinas IL-12 e IL-15 retrata uma resposta celular eficiente, associadas ao aumento de citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e à redução na expressão das moléculas proteicas PD-1 (*programmed death-1*) e seus ligantes em células esplênicas de cães com LCan (COSTA et al., 2020). No caso da infecção por *L.*

*infantum*, a intensa expressão de PD-1 é deletéria, por suprimir a linfoproliferação e alterar a produção de citocinas estimuladoras de resposta T<sub>H</sub>1, contribuindo para o desenvolvimento de doença (COSTA et al., 2020). A célula T<sub>H</sub>17, frequentemente envolvida em doenças autoimunes, é controversa na leishmaniose, uma vez que essas células e suas citocinas IL-17 estão associados à cicatrização de lesões ou à piora do quadro clínico a depender da espécie de *Leishmania* envolvida (ROSSI; FASEL, 2018). Já o tipo celular T<sub>REG</sub>, produtor de IL-10, já é conhecidamente implicado à latência e resistência parasitárias (BANETH et al., 2008; ROSSI; FASEL, 2018).

Além da deposição de imunocomplexos, outros mecanismos patogênicos associados à infecção por *L. infantum* em um cão susceptível podem ser identificados, a exemplo da inflamação granulomatosa, ocasionando dermatite nodular, e da produção de autoanticorpos que culminam em trombocitopenia imunomediada (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). Portanto, o tipo de resposta imunológica desenvolvida individualmente pelo cão resulta na resolução do quadro clínico ou na permanência no estado de doença clínica progressiva. Um dos fatores que influenciam a suscetibilidade ou resistência à infecção por *L. infantum* é a genética, uma vez que já se demonstrou que polimorfismos e mutações de genes resultam em raças caninas mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença do que outras (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

A LCan cursa com quatro estádios clínicos propostos pelo grupo LeishVet (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). O primeiro estádio é identificado como leve, cujas manifestações clínico-patológicas não são observadas ou geralmente são brandas. Normalmente, os responsáveis não levam os seus cães ao atendimento médico veterinário no estádio clínico inicial, porque não percebem doença no cão. O estádio II cursa com doença moderada, caracterizada por sinais clínicos visíveis como dermatoses variadas, onicogrifose, linfadenomegalia, inapetência, emagrecimento, febre e epistaxe. O estádio III é caracterizado pelos sinais clínicos do estádio II associados a anemia, elevação de proteínas séricas e início de comprometimento renal, com proteinúria e relação proteína-creatinina urinária (UPC) superior a 1. Já o estádio IV, doença grave, é caracterizado por comprometimento renal avançado, com azotemia e uremia. Os responsáveis levam os seus cães à clínica médica geralmente quando a doença cursa com estádio moderado e as principais queixas apontadas são problemas de pele, emagrecimento e apatia. O estadiamento clínico na LCan é importante para a condução clínica na escolha da melhor terapêutica a ser instituída, e para definição do prognóstico do paciente.

### 2.2.2. Patologia clínica

Os achados clínico-patológicos mais frequentes na LCan são anemia não-regenerativa, linfopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e proteinúria (PALTRINIERI et al., 2016; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018). A anemia na LCan pode ser resultante da perda, redução da produção e/ou destruição de eritrócitos (HARVEY et al., 2012). Em doenças inflamatórias crônicas, o sequestro de ferro resulta em baixos níveis de ferro na circulação; além disso, a anemia decorre também da intensificação da produção de citocinas e mediadores inflamatórios que inibem a eritropoiese, e/ou de dano na membrana eritrocitária causado por agentes oxidantes gerados cronicamente e que contribuem para reduzir a vida útil dos eritrócitos (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; HARVEY et al., 2012; GOTO et al., 2017; DE PINHO et al., 2019).

A linfopenia nos cães com LCan pode ser secundária a uma resposta ao estresse crônico que se instala nos cães doentes devido à inflamação (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018) e/ou a distúrbios na mielopoiese desses cães (NICOLATO et al., 2013). Na resposta inflamatória à LCan, pode ocorrer um aumento na produção de linfócitos resultante do recrutamento de células frente à infecção, porém pode haver uma redistribuição aos órgãos alvo com consequente redução na circulação sanguínea periférica (BOURDOISEAU et al., 1997). A linfopenia inflamatória, de uma maneira geral, parece ser induzida principalmente à ação de  $IFN\alpha$ , que pode estimular a apoptose linfocitária e depleção linfoide (HARVEY et al., 2012). A linfopenia também pode ocorrer quando a arquitetura dos linfonodos é desfeita, a exemplo do que ocorre na inflamação granulomatosa generalizada, impedindo a recirculação normal dos linfócitos (HARVEY et al., 2012).

A disproteinemia, definida como uma concentração anormal de proteínas séricas, é uma das alterações mais frequentes na LCan (CIARAMELLA et al., 1997; PALTRINIERI et al., 2016; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018), com consequente alteração na razão albumina e globulina (A/G). A hiperproteinemia com hiperglobulinemia pode ser explicada por uma proliferação de células B que produzem anticorpos policlonais (KOUTINAS e KOUTINAS, 2014). A hiperglobulinemia na LCan é resultante da perpetuação da inflamação, uma vez que a resposta humoral é ineficaz contra a infecção, além de gerar autoanticorpos, anticorpos anti-histonas e favorecer a formação de imunocomplexos na circulação (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). A hipoalbuminemia pode ser decorrente de doenças renais, mais precisamente de lesão glomerular persistente, associadas a um pior prognóstico (GEISWEID et al., 2016). Em animais saudáveis, uma pequena parte da albumina passa pelos glomérulos, porém a maior parte deve ser retida no organismo (THRALL et al., 2014). Nas doenças glomerulares, ocasionadas pela

LCan, a albumina pode passar com facilidade pelos glomérulos lesionados, uma vez que eles perdem sua funcionalidade devido à deposição de imunocomplexos (ZATELLI et al., 2003). A albumina pode ser reduzida também nos processos inflamatórios, induzida principalmente por IL-6, sendo caracterizada como uma proteína de fase aguda negativa (BOLOGA et al., 1998; THRALL et al., 2014).

A proteinúria é útil basicamente para diagnosticar doenças renais, principalmente afecções glomerulares, sendo a primeira alteração que antecede a hipoalbuminemia, a azotemia e a síndrome nefrótica (THRALL et al., 2014). A quantificação da proteinúria renal é um método apropriado para identificação de doenças renais, predição de doenças glomerulares e monitoramento de doenças renais (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; THRALL et al., 2014). Os cães infectados por *L. infantum* são propensos a desenvolverem patologias no sistema renal, caracterizadas por lesão celular e tecidual pela presença do parasito e por lesões indiretas devido à resposta inflamatória; porém, a azotemia não é um achado frequente nos exames laboratoriais, diferentemente da proteinúria, constantemente observada (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

### 2.2.3. Diagnóstico da infecção

O Ministério da Saúde brasileiro, por meio da nota técnica conjunta 01/2011, estabeleceu que o diagnóstico da LCan no âmbito epidemiológico deve ser realizado pelos métodos: (1) o teste rápido DPP® LVC como teste de triagem, e (2) o ELISA indireto como teste confirmatório (BRASIL, 2018). O DPP® utiliza a proteína recombinante rk28, uma junção de duas proteínas de *L. infantum* (k39 e k26) (BOARINO et al., 2005).

Apesar de serem ferramentas importantes no plano diagnóstico a partir da suspeita clínica de LCan, os testes sorológicos não são definitivos, pois podem resultar falsos positivos devido a reações cruzadas com anticorpos produzidos contra outros agentes etiológicos e endêmicos nas mesmas regiões, a exemplo de *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Tripanosoma cruzi* (FERREIRA et al., 2007; TRONCARELLI et al., 2009; ZANETTE et al., 2014). Os resultados sorológicos falsos negativos também podem ocorrer em cães resistentes que apresentam infecção subclínica ou naqueles que têm doença grave decorrente de infecção ativa e associada à incapacidade de montar uma resposta imune (GRIMALDI et al., 2012).

A coinfeção entre *L. infantum* e outros patógenos é uma realidade no Brasil (KRAWCZAK et al., 2015; DA SILVEIRA et al., 2018) a exemplos da ehrlichiose, babesiose,

anaplasmose e hepatozoonose. Portanto, uma abordagem cautelosa no diagnóstico é necessária para implantar tratamentos adequados para se obter uma resposta terapêutica efetiva.

A microscopia para observação direta do parasito em lâminas de aspirado de medula óssea, linfonodo e esfregaço sanguíneo é comumente utilizada no diagnóstico de LCan (MAIA e CAMPINO, 2008). Os esfregaços são corados com Giemsa, Leishman ou Panótico rápido e visualizados em microscópio. Uma única forma amastigota visibilizada dentro ou fora das células do sistema fagocítico mononuclear confirma o diagnóstico. O exame parasitológico em esfregaços continua sendo o padrão-ouro, com especificidade de 100%, mas a sua sensibilidade pode variar de acordo com a carga parasitária, o processamento, o tipo de amostra biológica utilizada e a experiência do observador (BARBOSA et al., 2012).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido cada vez mais empregada, não somente nas áreas das pesquisas, como também na rotina hospitalar, auxiliando o médico veterinário na obtenção do diagnóstico preciso. A PCR apresenta boa especificidade, uma vez que identifica a presença de fragmentos do DNA do agente infeccioso no hospedeiro. A técnica também apresenta boa sensibilidade, e permite a utilização de diversas amostras biológicas (MAIA; CAMPINO, 2008). A PCR em tempo real (qPCR) permite quantificar a carga parasitária na amostra testada, sendo importante tanto para o diagnóstico quanto para o monitoramento da infecção (MAIA; CAMPINO, 2008), além de permitir estimar a eficácia do tratamento ou a evolução da doença (FRANCINO et al., 2006). As amostras de aspirado de órgãos linfóides, como o baço, linfonodos ou medula óssea são escolhidas para o diagnóstico molecular das leishmanioses, já que concentram maior quantidade de parasitos, o que facilita sua detecção (BARROUIN-MELO et al., 2006; MAIA; CAMPINO, 2008). O sangue é utilizado no diagnóstico molecular da infecção, porém deve ser evitado, uma vez que apresenta menos parasitos quando comparado a outros tecidos linfóides, pelo fato de a parasitemia não ser constante nas infecções por *Leishmania* (LOMBARDO et al., 2012; SOLCÀ et al., 2014), podendo ocasionar resultados falsos-negativos e testes menos sensíveis.

### **2.3. Biomarcadores preditivos de prognóstico e de monitoramento de tratamento**

A ciência muito tem almejado descobrir biomarcadores sensíveis para prognóstico, caracterização de susceptibilidade e resistência e monitoramento de tratamento nas leishmanioses. Cães doentes que tendem a apresentar 1) anemia normocítica normocrômica não regenerativa, 2) linfopenia, 3) disproteinemia persistente, 4) proteinúria e 5) azotemia renal têm um pior prognóstico, sendo, portanto estes, importantes biomarcadores de prognóstico

(PALTRINIERI et al., 2016; MAIA; CAMPINO, 2018). Como marcadores de monitoramento de um tratamento eficaz, as globulinas séricas devem apresentar progressiva redução associada a uma tendência à elevação da relação A/G. Valores de proteína C reativa sérica também devem reduzir, seguidos de proteína urinária, a depender do nível de comprometimento renal inicial do paciente (GEISWEID et al., 2012; PALTRINIERI et al., 2016; MAIA; CAMPINO, 2018). Em um estudo recente em pacientes humanos, os autores identificaram parâmetros metabolômicos – alantoína, glutamina, taurina e piruvato – que se mostraram mais elevados nos pacientes que responderam eficientemente ao tratamento com antimoniato de meglunina para leishmaniose cutânea, do que naquele grupo não respondedor, concluindo que esses parâmetros poderiam ter valor preditivo de resposta terapêutica (VARGAS et al., 2019). Marcadores genéticos moleculares e marcadores sorológicos (BHATTACHARYYA et al., 2014; CARNIELLI et al., 2018) também têm sido alvo de estudos na busca de marcadores preditivos e prognósticos das doenças parasitárias de curso crônico.

#### **2.4 Biomarcadores de estresse oxidativo no diagnóstico de doenças inflamatórias crônicas e na LCan**

As células da imunidade inata prontamente reagem à entrada de agentes patogênicos no organismo do hospedeiro, a fim de fornecer proteção e homeostase. Fagócitos produzem diversos compostos oxidantes, dentre eles as espécies reativas de oxigênio (EROS) e óxido nítrico (NO), que são liberados quando as enzimas NADPH-oxidase 2 e NO sintase (iNOS) são ativadas, respectivamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; PALTRINIERI, 2013). Os compostos oxidantes também são produzidos fisiologicamente durante a fosforilação oxidativa para a geração de energia (ATP), necessária em todos os processos que envolvem a resposta imunológica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). As EROS são moléculas altamente reativas compostas por ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila dentre outras que são formadas devido à redução química do oxigênio (BARBOSA et al., 2010). Em uma redução, o elemento químico ganha elétrons em sua última órbita, podendo se tornar instável. Portanto, a NADPH-oxidase 2 oxida o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) em EROS, e a iNOS converte arginina em citrulina liberando o gás NO (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Com o propósito de neutralizar os compostos oxidantes produzidos nos processos biológicos celulares e assim evitar danos extensos aos tecidos, moléculas antioxidantes são produzidas (BARBOSA et al., 2010). Porém, quando há desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e antioxidantes, as células podem sofrer danos oxidativos denominados

de estresse oxidativo (PALTRINIERI, 2013). O excesso de EROS causa peroxidação lipídica nas membranas celulares, e consequentemente aumento da apoptose e aumento do estresse oxidativo devido à depleção de compostos antioxidantes totais (ALMEIDA et al., 2013). As EROS possuem meia-vida curta e, por isso, suas mensurações diretas acabam sendo inviáveis. Assim, o que pode ser medido são os vários produtos dos danos produzidos pelo estresse oxidativo. Alguns produtos da peroxidação lipídica são reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA). Quando o TBA é exposto a uma amostra biológica é possível detectar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (GROTTO et al., 2009). Uma das principais substâncias reativas é o malondialdeído (MDA) que são produtos da peroxidação lipídica, ou seja, produtos formados a partir da degradação de ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, causando desorganização da sua estrutura e função (SERARSLAN; YILMAZ; SÖĞÜT, 2005).

As moléculas antioxidantes podem ser divididas entre enzimáticas e não-enzimáticas (BARBOSA et al., 2010). Antioxidantes enzimáticos são representados pelo superóxido dismutase (SOD) que catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio; pela enzima glutathiona peroxidase (GSH-px) que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, assim como a catalase (CAT) (BARBOSA et al., 2010).

O peróxido de hidrogênio não neutralizado gera radicais hidroxilas (OH<sup>-</sup>) mediante participação do ferro e cobre, contra os quais não existe sistema enzimático de defesa especializada (SCHNEIDER; DE OLIVEIRA, 2004). O ferro e o cobre participam de muitas reações de oxido-redução, por isso são considerados catalisadores das reações de geração de radicais livres (BARBOSA et al., 2010). A obtenção de ferro é um requisito nutricional vital, essencial para a sobrevivência de muitas espécies, incluindo a *Leishmania* que, no entanto, é vulnerável à toxicidade do ferro, que por sua vez é um amplificador de EROS (ZAIDI et al., 2017). Um mecanismo orgânico que previne ou minimiza a formação de radicais livres é a ligação dos íons de ferro às proteínas transferrina ou ferritina (BARBOSA et al., 2010; ZAIDI; SINGH; ALI, 2017).

O grupo dos antioxidantes não-enzimáticos é composto principalmente por β-caroteno, ácido ascórbico, α-tocoferol e oligoelementos como o zinco, cobre, manganês e selênio, de origem endógena ou dietética (RODRIGO; GUICHARD; CHARLES, 2007). Cobre, zinco, manganês e selênio são importantes no controle do estresse oxidativo, agindo como cofatores de enzimas antioxidantes SOD e GSH-px (BARBOSA et al., 2010) e, portanto, podem ser mensurados no soro também como biomarcadores de equilíbrio ou de estresse oxidativo (HAGEN et al., 2019).

O organismo do hospedeiro infectado por protozoários do gênero *Leishmania* desenvolve estresse oxidativo, devido ao consumo intensificado de moléculas e mecanismos antioxidantes para compensar o aumento nos níveis de oxidantes totais, levando à redução nos parâmetros de capacidade antioxidante total e elevação nos índices de peroxidação lipídica celular (ALMEIDA et al., 2013; BILDIK, 2004; HEIDARPOUR et al., 2012). Os parasitos *Leishmania* sp. evadem o sistema imunológico para se manterem vivos e se multiplicam dentro dos fagolisossomos no hospedeiro (ANGIULLI et al., 2015). Além da proteção gerada pela espessa camada lipídica contendo lipofosfoglicanos (LPG) na membrana do protozoário, *Leishmania* induz macrófagos a produzirem arginase, que compete com a iNOS, diminuindo assim a produção de NO parasitotóxico (ROSSI; FASEL, 2018).

Existem poucos trabalhos que explicam as alterações dos biomarcadores de estresse oxidativo em cães estadiados e tratados com fármacos leishmanicidas, durante um período prolongado. Em um desses poucos trabalhos, os autores verificaram que há um aumento nas concentrações séricas dos biomarcadores antioxidantes em cães com LCan acompanhados por seis meses após tratamento com antimoniato de meglumina (RUBIO et al., 2016). Outros autores, por meio da análise proteômica, verificaram que as concentrações séricas da apolipoproteína-A1 que estavam reduzidas em cães com LCan, exibiram aumento após tratamento com antimoniato de meglumina combinado com alopurinol, e sugerem que esta proteína seja um potencial biomarcador de monitoramento do tratamento (ESCRIBANO et al., 2016). Porém, esses cães só foram acompanhados por um mês. Ambos os trabalhos relatam uma diminuição significativa nos níveis de ferritina e proteína C reativa, marcadores de inflamação, no soro dos cães tratados.

Outras doenças inflamatórias crônicas, de caráter infeccioso ou não, já foram caracterizadas por apresentarem elevação de estresse oxidativo na clínica de pequenos animais, a exemplo da hepatite canina e felina (CENTER; WARNER; ERB, 2002), parvovirose (GAYKWAD et al., 2018); doença renal crônica (ALBOROUGH et al., 2020), osteoartrite (BARROUIN-MELO et al., 2016), dermatite atópica (ALMELA et al., 2018) e glaucoma agudo (CHEN et al., 2015).

## **2.5. Tratamento da LCan**

### **2.5.1. Fármacos antiparasitários**

O protocolo comumente citado na literatura como sendo de primeira linha no tratamento de LCan é a associação de antimoniato de meglumina (Glucantime®, 100mg/kg diariamente,

por via subcutânea, durante 28 dias) ao alopurinol (10mg/kg, a cada 12 horas, via oral) (MIRO et al., 2017). A associação farmacológica apresenta bons resultados a longo prazo (TORRES et al., 2011). Entretanto, o uso do antimoníato de meglumina em cães no Brasil é proibido, segundo a Portaria Interministerial arbitrada pelo Ministério da Saúde (Nº 1.426/2008), que desautoriza o tratamento de cães com LCan utilizando produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a exemplos do próprio antimoníato de meglumina, a anfotericina B lipossomal e o desoxicolato de anfotericina B.

Apesar de ter uma ação antiparasitária eficaz, o antimoníato de meglumina é tóxico para os rins, fígado, pâncreas e coração em pacientes humanos submetidos ao tratamento, com relatos de hiperlipase e hiperamilase (RODRIGUES et al., 1999; KATO et al., 2014; LYRA et al., 2016). Além disso, há relatos de resistência parasitária ao medicamento (PONTE-SUCRE et al., 2017; SRIVASTAVA et al., 2017) e ocorrência de efeitos adversos como abscessos cutâneos e celulite em cães, em decorrência de sua via de administração (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Já foi demonstrado que o antimoníato de meglumina, assim como a própria infecção por *L. infantum*, induz danos ao DNA em células de mamíferos por oxidação de bases nitrogenadas (MOREIRA et al., 2017), caracterizando seu potencial mutagênico.

A miltefosina também é utilizada como fármaco leishmanicida no tratamento de LCan, e alguns trabalhos têm defendido que o fármaco promove uma boa resposta clínica (NOGUEIRA et al., 2019). Entretanto, não há um consenso na literatura quanto à redução da carga parasitária nos cães tratados com esse fármaco, que parece não acompanhar a melhora dos sinais clínicos nos cães infectados (ANDRADE et al., 2011). Além disso, a terapêutica com miltefosina resultou em uma maior taxa de recidiva da doença em cães quando comparada ao uso do antimoníato de meglumina (MANNA et al., 2015). Em humanos, há relatos de resistência parasitária ao miltefosine nas populações com LV tratadas no subcontinente indiano (RIJAL et al., 2013). Em 2016, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e o Ministério da Saúde autorizaram o registro do produto miltefosina (Milteforan®) no Brasil (por meio da nota técnica conjunta 001/2016), e conseqüentemente, a sua utilização no tratamento de cães doentes.

O metronidazol é um fármaco que apresenta um efeito anti-*Leishmania* eficaz *in vitro*, entretanto, apresenta menor eficácia que o antimoníato de meglumina na redução da carga parasitária de *Leishmania* em cães (CIARAMELLA et al., 2003). Outros estudos demonstraram que a associação dos fármacos metronidazol (25mg/kg) e espiramicina (150.000 UI/kg) foi bem sucedida no tratamento de LCan, sendo indicada como alternativa aos leishmanicidas

considerados de primeira linha (PENNISI et al., 2005). O cetoconazol promoveu uma boa redução de carga parasitária em baço de camundongos experimentalmente infectados (GANGNEUX et al., 1999) e remissão clínica em cães com LCan, *in vivo* (NOLI; AUXILIA, 2005). Nery et al. (2017), em estudo prospectivo, demonstraram, por meio de qPCR e xenodiagnóstico, que após 40 dias de tratamento utilizando a combinação de fármacos anti-*Leishmania* metronidazol e cetoconazol, seguida de manutenção com alopurinol por um ano, os cães infectados por *L. infantum* apresentaram redução da carga parasitária esplênica e deixaram de ser infecciosos para flebotomíneos.

O alopurinol, medicamento leishmanioestático, é frequentemente utilizado na terapêutica da LCan. Pode ser prescrito concomitantemente ou após o uso dos leishmanicidas, na dose de 10mg/kg de peso, por um período mínimo de 6 meses (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Apesar de seguro, o alopurinol pode ocasionar alguns efeitos colaterais como xantínúria, mineralização renal e urolitíase em casos de tratamento prolongado (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Independentemente do quimioterápico anti-*Leishmania* utilizado no tratamento da LCan, é sabido que a cura parasitológica raramente é alcançada, e recidivas clínicas são frequentes (MANNA et al., 2015; MIRO et al., 2017). Entretanto, o tratamento do cão infectado e doente é necessário, pois tende a cursar com redução de carga parasitária e redução de infecciosidade canina aos flebotomíneos (MIRO et al., 2017; TRAVI et al. 2018), com melhoria do quadro clínico e laboratorial, culminando com maiores taxas de sobrevivência.

### **2.5.2. Fármacos anti-inflamatórios**

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico desencadeada por diversos fatores, incluindo patógenos, injúria celular, compostos tóxicos ou exposição à radiação, podendo, portanto, ser de origem infecciosa ou não infecciosa (TOGHUEO, 2019). A inflamação crônica é comumente detectada em pacientes com leishmaniose, devido à produção contínua de citocinas pró-inflamatórias (CARRILLO et al., 2009). A fim de controlar a inflamação crônica e ineficaz, induzida pelo protozoário, a utilização de fármacos anti-inflamatórios, comumente esteroidais, é uma prática frequente na condução terapêutica do cão com LCan (CIARAMELLA et al., 2003). Sua finalidade é reduzir a produção de imunoglobulinas, contribuindo para minimizar a formação e deposição de imunocomplexos responsáveis pelas patologias graves que evoluem no curso da enfermidade (CIARAMELLA et al., 2003).

Na Europa, o uso de anti-inflamatórios esteroidais tem sido reduzido devido aos seus efeitos adversos, dando lugar ao uso de imunostimuladores de resposta celular, a exemplo de extratos de cogumelos – Composto Ativo Correlacionado com Hexose (AHCC) ou proteínas P-MAPA (SANTIAGO et al., 2013; SEGARRA et al., 2018) . Recentemente, foi demonstrado que o uso de N-acetilcisteína resultou em uma redução significativa nos índices de estresse oxidativo no fígado de ratos Balb/c infectados com *L. amazonensis*, encorajando o seu uso na terapêutica antioxidativa e anti-inflamatória na LCan (GASPAROTTO et al., 2017; CRUPI et al., 2020).

### **2.5.3. Fármacos e substâncias adjuvantes**

#### **2.5.3.1. Imunostimuladores**

Imunostimuladores são utilizados no tratamento adjuvante à terapia convencional da LCan com o objetivo de melhorar a resposta clínica e reduzir a dose de quimioterápicos anti-*Leishmania*, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de resistência e efeitos colaterais adversos (MIRO et al., 2017). Fármacos imunostimuladores, a exemplo da domperidona, têm o objetivo de melhorar os mecanismos de defesa do sistema inato do organismo, ativando células fagocíticas e potencializando a morte do protozoário e são utilizados até mesmo como agentes profiláticos (MIRÓ et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018). O tratamento com a domperidona culmina com melhora clínica e diminuição dos níveis de anticorpos em cães (GÓMEZ-OCHOA et al., 2009), porém pouco se sabe sobre redução de carga parasitária após sua utilização (TRAVI et al., 2018).

Outros moduladores da resposta imunológica também são mencionados na literatura, como os AHCC (*Active Hexose Correlated Compound*) cujos resultados são baseados na redução significativa dos anticorpos anti-*Leishmania* associado a uma menor taxa de progressão da doença nos cães (SEGARRA et al., 2018). Um agregado de proteínas imunomoduladoras, denominado P-MAPA, também induziu estimulação da imunidade celular sem ocasionar efeitos adversos nos cães, com melhoria dos sinais clínicos e redução de carga parasitária canina (SANTIAGO et al., 2013; MIRÓ et al., 2017).

#### **2.5.3.2. Suplementos nutricionais**

Stephen DeFelice, criador do conceito nutracêutico, o descreveu como “um alimento ou parte de um alimento que tem benefícios médicos ou de saúde, incluindo a prevenção e

tratamento de doenças”, em 1989 (DALIU; SANTINI; NOVELLINO, 2018). O nutracêutico nada mais é do que um produto purificado a partir dos alimentos, mas é apresentado ao consumidor com o mesmo aspecto dos medicamentos (como comprimidos, cápsulas, xaropes e soluções) (PINTO, 2010). Como consequência, o indivíduo é exposto a uma dose muito mais alta de compostos bioativos do que aquela que normalmente ingeriria por meio da dieta (PINTO, 2010). Como exemplo de nutracêuticos, temos cápsulas ou comprimidos de ômega 3, fitoesterol, ácido linoleico, glucosamina, condroitina (NASRI et al., 2014; VALENZUELA; VALENZUELA, 2014).

Os ácidos graxos ômega 3 são definidos como lipídios da família das gorduras poli-insaturadas, dentre as quais o DHA (ácido docosahexanoico) e o EPA (ácido eicosapentaenoico) são encontrados nos peixes, e o ALA (ácido alfa-linoleico) nas plantas (DEFILIPPIS; SPERLING, 2006). Os ácidos graxos ômega 3 são alvos de estudos quanto às suas propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, cardio e renoprotetoras, além de prevenção contra doenças que cursam com déficit cognitivo, porém alguns estudos apresentam resultados ainda controversos sobre a sua eficácia em alguns sistemas orgânicos, a exemplo da cardioproteção (WEITZ et al., 2010; THOMAS et al., 2015; BACKES et al., 2016; PLUTA et al., 2017; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018; FREITAS; CAMPOS, 2019; MANSON et al., 2019). Apesar dos seus benefícios, possíveis efeitos adversos podem ocorrer devido à suplementação inadequada, incluindo alterações na função plaquetária, efeitos adversos gastrointestinais como diarreia, comprometimento da cicatrização de feridas e aumento na peroxidação lipídica (LENOX; BUER, 2013).

A suplementação nutracêutica à base de óleo de peixe, óleo de krill, cogumelos secos (*Cordyceps sinensis* L.) e plantas medicinais veiculadas sob forma medicamentosa, vendida comercialmente, tem apresentado uma boa efetividade na resposta imunomoduladora na LCan, associada a um predomínio de resposta celular e melhora clínica significativa dos cães avaliados (LOMBARDI et al., 2019; MASTELLONE et al., 2020).

As vitaminas, de uma forma geral, são um grupo de compostos orgânicos essenciais, ou seja, que não são sintetizados pelo organismo animal e, portanto, devem ser consumidas por meio da dieta (KENNEDY, 2016). As vitaminas do complexo B são um conjunto de oito vitaminas essenciais hidrosolúveis que desempenham um papel fundamental no funcionamento fisiológico do organismo, principalmente como coenzimas em diversas reações enzimáticas do metabolismo (KENNEDY, 2016). Tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), biotina (B7), folato (B9) e cianocobalamina (B12) trabalham individualmente ou em conjunto para a homeostase e sobrevivência do indivíduo, sobretudo na

geração de energia, nas reações de oxido-redução, síntese de aminoácidos, ácidos graxos, colesterol e ácidos nucleicos, sendo precursores diretos de substratos metabólicos (KENNEDY, 2016). Deficiência das vitaminas do complexo B pode ocasionar diversas patologias físicas e cognitivas (MIKKELSEN; APOSTOLOPOULOS, 2018).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar parâmetros de patologia clínica como candidatos a marcadores de prognóstico de resposta a tratamento em cães sob intervenção terapêutica para leishmaniose canina por *Leishmania infantum* à base de fármacos anti-*Leishmania* associados a suplementos nutricionais como adjuvantes terapêuticos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

1. Investigar o potencial de diferentes parâmetros hematológicos e bioquímicos como biomarcadores preditivos de resposta terapêutica e de monitoramento do tratamento em cães com leishmaniose canina (LCan) por *Leishmania infantum*, naturalmente adquirida;
2. Mensurar parâmetros bioquímicos séricos indicadores de balanço oxidante/antioxidante (redox) para determinar seu potencial biomarcador da qualidade da resposta terapêutica na LCan;
3. Avaliar o efeito da adição de suplementos nutricionais com propriedades antioxidantes a fármacos anti-*Leishmania* sobre a resposta clínica e o balanço redox e a carga parasitária de cães ao longo de 12 meses de monitoramento no tratamento da LCan;

### **4. HIPÓTESE**

Cães com leishmaniose causada por *Leishmania infantum* podem se beneficiar do tratamento com fármacos anti-*Leishmania* de segunda linha associados a suplementos nutricionais com propriedades antioxidantes. Os benefícios terapêuticos podem se traduzir em melhora do quadro clínico, redução da carga parasitária e manutenção ou restauração do balanço redox. Como os efeitos benéficos do tratamento podem não ser homogêneos em um

grupo de cães naturalmente portadores de LCan, parâmetros bioquímicos podem ser selecionados como biomarcadores metabólicos de estresse oxidativo e preditivos de capacidade de resposta ao tratamento.

**Capítulo I** – Publicado na Revista *Microorganisms*. Fator de impacto: 4.167 (2018).  
DOI: 10.3390/microorganisms8050745

## **Modelo matemático usando biomarcadores preditivos da leishmaniose canina na quimioterapia**

Rafaela de Sousa Gonçalves et al.

### **Resumo**

Os parâmetros preditores de possíveis resultados da terapia com leishmaniose canina (LCan) podem ajudar nas decisões terapêuticas e nos cuidados com a saúde animal. Aqui, objetivamos desenvolver um método diagnóstico com valor preditivo analisando dois grupos de cães com LCan, aqueles que exibiram uma diminuição na carga parasitária após tratamento antiparasitário (grupo: respondedores) e aqueles que mantiveram alta carga parasitária apesar do tratamento (grupo: não respondedores). Os parâmetros analisados foram carga parasitária determinada por qPCR, hemograma, bioquímica sérica e assinatura de expressão gênica relacionada ao sistema imunológico. Um modelo matemático foi aplicado à análise desses parâmetros para prever quão eficiente seria sua resposta à terapia. Os cães respondedores restauraram os parâmetros hematológicos e bioquímicos para os valores de referência e exibiram um perfil de ativação das células Th1 com tendência linear a atingir estágios de alteração clínica leve. Diferentemente, os que não responderam desenvolveram uma resposta Th1/Th2 mista e exibiram marcadores de lesão hepática e renal. A contagem de eritrócitos e o fósforo sérico foram identificados como marcadores preditivos da resposta terapêutica em um período inicial de avaliação da LCan. Os resultados apresentados neste estudo são altamente encorajadores e podem representar um novo paradigma para assistência futura aos médicos, interferindo precocemente na abordagem terapêutica, com uma definição mais precisa no prognóstico do paciente.

**Palavras-chave:** *Leishmania*; modelo matemático; parâmetros bioquímicos; parâmetros hematológicos; tratamento.

## Introdução

A leishmaniose canina (LCan) é uma doença grave causada pelo protozoário *Leishmania infantum* [1, 2, 3]. Como infecção zoonótica, *L. infantum* é um grande problema de saúde, pois também causa leishmaniose visceral humana, uma doença tropical negligenciada, nas Américas, Europa, Norte da África, Oriente Médio e China [4]. Os cães são suscetíveis ao desenvolvimento de altas cargas parasitárias, desempenhando um papel fundamental no ciclo de transmissão de *L. infantum* via flebotomíneos em áreas endêmicas [5, 6]. Cargas mais altas de parasitos em cães estão relacionadas a doenças clínicas mais graves [7] e maior infecciosidade para flebotomíneos [5]. Como a doença está associada à infecção ativa [8], a eficácia do tratamento da LCan deve ser primariamente centrada em sua capacidade de reduzir a carga de *L. infantum* nos hospedeiros.

O tratamento da LCan é um desafio para os médicos veterinários em relação à eficácia antiparasitária, efeitos adversos e custo. Os medicamentos leishmanicidas atuais, como antimoniais, miltefosina e alopurinol, podem curar clinicamente cães ou melhorar temporariamente os sinais clínicos, mas não existe evidência de eficácia em termos de cura parasitológica para nenhum deles [8, 9]. Conseqüentemente, as recorrências clínicas associadas a altas cargas parasitárias em vários cães tratados são frequentes em diversos intervalos de tempo após o tratamento [10]. No Brasil, onde a maioria dos casos sul-americanos de infecção por *L. infantum* ocorre, é proibido o uso de antimoniais para o tratamento de cães [11].

O sucesso de alguns protocolos leishmanicidas na redução da carga de *L. infantum* e no bloqueio da transmissão do parasito aos vetores flebotomíneos foi evidenciado por xenodiagnóstico [12, 13, 14]. No entanto, o fracasso da terapia anti-*Leishmania* depende dos efeitos terapêuticos dos medicamentos, da virulência inerente ao parasita, do desenvolvimento de resistência aos medicamentos, do estado imunológico e nutricional do hospedeiro, ou coinfeções, que contribuem decisivamente para a recorrência [15, 16]. O prognóstico da resposta ao tratamento depende em grande parte da gravidade da doença visceral, conforme determinado pelas alterações clínico-patológicas, particularmente as relacionadas à função renal [17, 18].

Como os cães respondem diferentemente aos tratamentos antiparasitários e ainda não existem ferramentas preditivas para discriminar os cães que respondem à terapia daqueles que mantêm altas cargas parasitárias, apesar do tratamento, nosso objetivo foi dedicar o presente estudo a esse aspecto. Este estudo foi uma análise longitudinal retrospectiva dos parâmetros parasitológicos, bioquímicos e hematológicos em uma coorte de cães tratados com LCan com

fármacos anti-*Leishmania* de segunda linha, conforme relatado na literatura [8, 9, 19, 20, 21, 22]. O objetivo do estudo foi identificar biomarcadores e desenvolver um modelo matemático de protótipo com valor preditivo para estimar o sucesso de uma terapia anti-*Leishmania* como uma ferramenta para melhorar o diagnóstico e o monitoramento do tratamento.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Aprovação ética**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia, Brasil (CEUA-UFBA, n. 19/2011), fundamentado nos princípios bioéticos da experimentação animal. Todos os procedimentos foram seguidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e seguiram rigorosamente a lei brasileira de “Procedimentos para o Uso Científico de Animais” (11.794 / 2008). Toda manipulação em cães, invasiva ou não invasiva, foi realizada ou monitorada por médicos veterinários. O grupo de cães não respondedores foi projetado com base na carga parasitária, cujo teste quantitativo foi realizado no final do estudo. Portanto, durante todo o curso do estudo, cães que desenvolveram outras doenças ou adquiriram coinfeções foram removidos para receber tratamento adicional.

### **2.2 Animais e amostragem**

Uma análise longitudinal de um ano dos parâmetros hematológicos e bioquímicos foi realizada em 26 cães, naturalmente infectados por *L. infantum* no estado da Bahia, Brasil, submetidos ao tratamento antiparasitário. Os critérios de inclusão foram: infecção confirmada por *Leishmania* spp. por técnicas parasitológicas e/ou moleculares, e consentimento dos responsáveis pelo tratamento com o regime antiparasitário multidrogas (metronidazol + cetoconazol + alopurinol). A coexistência de outras doenças ou coinfeções e LCan terminal foram os critérios de exclusão no início e em qualquer outro momento do exame no decorrer do acompanhamento. Os cães foram avaliados em seis momentos diferentes durante o ano. O tempo 0 (T0) consistiu no momento em que os cães chegaram ao Ambulatório de Leishmaniose Zoonótica no Hospital Universitário de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (ALZ-UFBA) para diagnóstico e primeiros cuidados clínicos. Os cães foram avaliados mensalmente durante os primeiros três meses (T1, T2, T3) e depois no sexto (T6) e décimo segundo mês (T12) após o tratamento. Em cada avaliação, o sangue foi colhido da veia jugular ou cefálica e armazenado em tubos de EDTA a 10% (BD Vacutainer; Becton, Dickinson) para realização do hemograma e pesquisa de hematozoários. O sangue também foi coletado em tubos

sem anticoagulante (BD Vacutainer; Becton, Dickinson) para a determinação de parâmetros sorológicos e bioquímicos. A urina foi colhida por cistocentese (na fêmea) e cateterismo uretral (no macho) para realização da urinálise e da relação proteína-creatinina urinária (UPC). Para a colheita de amostras de baço e medula óssea por aspiração (realizada em T0, T6 e T12), foram utilizadas seringas e agulhas de 20 mL, 40×12 mm e 40×16 mm, respectivamente, inseridas em uma região anatômica-topográfica do baço [23] e esterno [24], com antisepsia local prévia e sedação leve com acepromazina (0,02 mg / kg).

### **2.3 Avaliação clínica e estadiamento**

Os cães foram avaliados clinicamente quanto à presença ou ausência de sinais clínicos compatíveis com LCan e definição de estadiamento clínico, conforme determinado pelas diretrizes do Grupo LeishVet [8]. Perda de peso, alterações de apetite, fâcies, coloração das mucosas, dermatopatias (úlceras, vasculite cutânea, onicogribose, descamação, alopecia, crostas, hiperqueratose, despigmentação do focinho, nódulo), linfadenopatia, oftalmopatia, presença ou ausência de febre, diarreia, epistaxe e aumento do baço por palpação. Com base em parâmetros clínicos e laboratoriais (subtópico 2.5), os cães foram categorizados em estadiamento clínico I (doença leve), II (doença moderada), III (doença grave) ou IV (muito grave a doença terminal).

### **2.4 Quimioterapia anti-*Leishmania***

O tratamento antiparasitário consistiu na administração de metronidazol (25 mg/kg/duas vezes ao dia) por 30 dias associado ao cetoconazol (10 mg/kg/uma vez ao dia) por 40 dias, seguido de um tratamento de manutenção com alopurinol (10 mg/kg/duas vezes ao dia) durante pelo menos um ano. A prednisolona foi administrada (começando com 0,5 mg / kg / duas vezes ao dia) por 30 dias (incluindo desmame gradual) [20, 25, 26] para minimizar a inflamação sistêmica por formação de imunocomplexos, e assim, indiretamente, para evitar lesão renal durante o curso inicial de quatro semanas de tratamento com drogas anti-*Leishmania*. O regime terapêutico multifármaco para LCan usado no presente estudo foi descrito anteriormente [14].

### **2.5 Parâmetros hematológicos e bioquímicos**

Hemograma, leitura do esfregaço sanguíneo para avaliar a morfologia celular e pesquisar hematozoários foram realizados conforme descrito [27]. Os seguintes parâmetros bioquímicos foram mensurados: enzimas (alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CK) e a isoenzima creatina quinase arginase

miocárdica (CK-MB), pseudocolinesterase e gama-glutamil transferase (GGT) (Cormay, Ianomianki, Polônia)), proteínas (proteína total e albumina (Cormay, Łomianki, Polônia)), substratos (creatinina e ureia) e eletrólitos (cálcio, fósforo e magnésio (Spinreact, Barcelona, Espanha)). A relação proteína-creatinina urinária (UPC) e a razão sérica de cálcio/fósforo também foram obtidas. Todas as variáveis foram dosadas no analisador bioquímico automático (Prestige 24i, Tóquio, Japão) e semiautomático (BioPlus-200, São Paulo, Brasil), conforme descrito [28].

## 2.6 Quantificação de globulina total e anticorpos anti-*Leishmania* específicos

Para a quantificação das globulinas, os valores totais de proteínas foram subtraídos dos valores de albumina. Anticorpos IgG anti- *Leishmania* específicos foram quantificados nos soros como descrito [29], com pequenas modificações, utilizando a técnica ELISA indireto. Placas de noventa e seis poços (BioLegend, San Diego EUA) foram revestidas com 10 µg/mL de antígenos solúveis de promastigotas de *L. infantum*. Após lavagem com tampão fosfato (PBS) a 3% e com tampão fosfato enriquecido com tween (PBS-T) a 0,05%, 100 µL/poço de soro canino diluído 1: 50.000 em PBS-T foram adicionados em duplicata e incubados por 30 minutos a 37°C. A reação foi concluída adicionando IgG-HRP anti-cão diluída a 1: 5000 (Bethyl Laboratories, Montgomery, EUA) por 30 min a 37 °C e incubação adicional com 0,5 mg/mL de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD, Sigma, Darmstadt Alemanha) por 10 min. A reação foi interrompida usando 50µL/poço de 3 M HCl. As placas foram lidas a 492 nm (Synergy, Biotek, Tokyo Japão).

## 2.7 Carga parasitária

O DNA da aspiração da medula óssea e do baço em T0, T6 e T12 foi extraído utilizando o *kit* comercial PureLink Genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade e a concentração do DNA de cada eluido foram avaliadas no espectrofotômetro L-QUANT (Loccus, São Paulo, Brasil). Para quantificação do DNA de *L. infantum* nas amostras de baço e medula óssea, foram realizados ensaios de qPCR utilizando o protocolo descrito [30], com algumas modificações. Os *primers* 5'-GGTTAGCCGATGGTGGTCTT-3'(frente); 5'-GCTATATCATATGTCCAAGCACTTACCT3'(reverso) e a sonda TaqMan (Applied Biosystems Foster City USA) (5'-ACCACCTAAGGTCAACCC-3') foram utilizados. O volume final da reação (25 µL) consistiu em 4 µL de DNA, padronizado na concentração de 20 ng/µL, 12,5 mL de Mastermix Universal® (Life Technology Corporation, Carlsbad EUA), 5 µM de cada primer e 10 µM da sonda

TaqMan. O qPCR foi realizado a 95° C por 10 min, 40 ciclos a 95° C por 15 se 60° C por 1 min. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. As reações foram realizadas no Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technology Corporation Carlsbad EUA).

## 2.8 PCR quantitativo

A expressão de mRNA esplênico de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-22, IL-4, IL-5 e IL-10 foi determinada usando PCR em tempo real. Os fragmentos de baço foram macerados para extração total de RNA usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad EUA), conforme recomendado pelo fabricante. A concentração de RNA foi determinada pela mensuração por OD260 usando um espectrofotômetro L-Quant 1.0 (Loccus, São Paulo, Brasil). A síntese de cDNA foi realizada usando 1 $\mu$ g de RNA total mais 10  $\mu$ L de mix principal de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Reações quantitativas de PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas para cada amostra em um termociclador Bio-Rad CFX96 Real-Time System C1000 (Bio-rad Berkeley USA). As sequências de *primers* foram obtidas da IDT (Lovaina, Bélgica) e exaustivamente testadas. Os oligonucleotídeos específicos são: IL2 (*forward*) CCCAAGAAGGCCACAGAATTTA, (*reverse*) TCCTTGGTGTCTGTCAAGTGAA; IL4 (*forward*) CTAGCACTCACCAGCACCTT, (*reverse*) CACGAGTCGTTTCTCGCTGT; IL5 (*forward*) GGCGATGGGAACCTGATGAT, (*reverse*) CGTGGGCAGTTTGGTTCTTC; IL10 (*forward*) CAAGCCCTGTCGGAGATGAT, (*reverse*) AGAAATCGGTGACAGCGTCG; IFNG (*forward*) TCAAATTCCTGTGAACGATCTGC, (*reverse*) TTATTTTCGATGCTCTGCGGC; TNFA (*forward*) CTCCAATAATCAGCCCTCTTG, (*reverse*) GGGTTTGCTACAACATGAGCTACT; GAPDH (*forward*) GCTGGTGCTGAGTATGTTGTGGAG, (*reverse*) CAGCAGAAGGAGCAGAGATATTA. O produto RT foi expandido usando o kit NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (NZYTech, Lisboa, Portugal) e os resultados foram normalizados para a expressão do gene Gapdh. Após a amplificação, os valores de ciclo *threshold* (valores Ct) foram calculados para todas as amostras e as alterações na expressão gênica foram analisadas no CFX Manager Software (Bio-Rad) e representadas como unidades arbitrárias (AU).

## 2.9 Análise Estatística

O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foram utilizados para análise dos dados entre dois grupos. Uma análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida por um

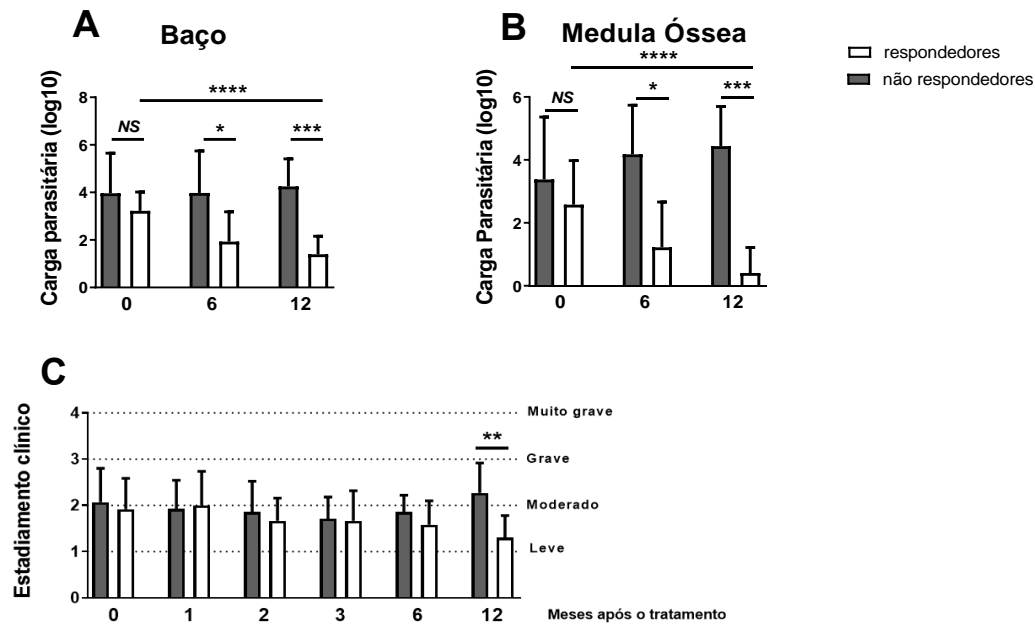
teste post-hoc de Bonferroni foram empregadas para comparações de vários grupos. Modelos de regressão logística exploratória foram realizados em R usando o pacote Redução de Viés em Modelos Lineares Generalizados em Resposta Binomial [31, 32]. O teste do qui-quadrado foi utilizado para análise estatística para avaliar a associação significativa entre as variáveis. Os dados são relatados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Os valores estatisticamente significativos são os seguintes: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. Os cães respondedores exibem uma diminuição nas cargas parasitárias no baço e na medula óssea, e melhora do estadiamento clínico

A evolução absoluta da carga parasitária de *Leishmania infantum* no baço e na medula óssea de uma coorte de cães em tratamento anti-*Leishmania* por 12 meses foi distinta entre dois grupos. Os cães que apresentaram uma redução significativa da carga parasitária de T0 a T12 foram agrupados como Respondedores à quimioterapia (GR, 46%, 12 cães), enquanto os que não apresentaram redução da carga parasitária foram agrupados como Não Respondedores (GNR, 54%, 14 cães; figura 1A, 1B). No T0, antes do tratamento, não houve diferenças nas cargas parasitárias entre os grupos nos dois órgãos (figura 1A, B), bem como no estadiamento clínico (figura 1C). No T6, o GR exibiu uma notável redução da carga parasitária em comparação com o GNR. Após um ano de tratamento (T12), as cargas parasitárias do GR foram significativamente menores do que as de T0 ( $p < 0,001$ ) em ambos os tecidos (figura 1A, B), tendo diminuído 97,3% e 98,5% na medula óssea e no baço, respectivamente. Em oposição, não foi observada diferença significativa para o GNR (figura 1A, B). No T0, os dois grupos apresentaram o mesmo estágio clínico II, caracterizado por doença moderada. Acompanhando os dados de carga parasitária, no T12, o GR exibiu em média uma doença leve (estágio I), enquanto o GNR permaneceu no estágio II (figura 1C).

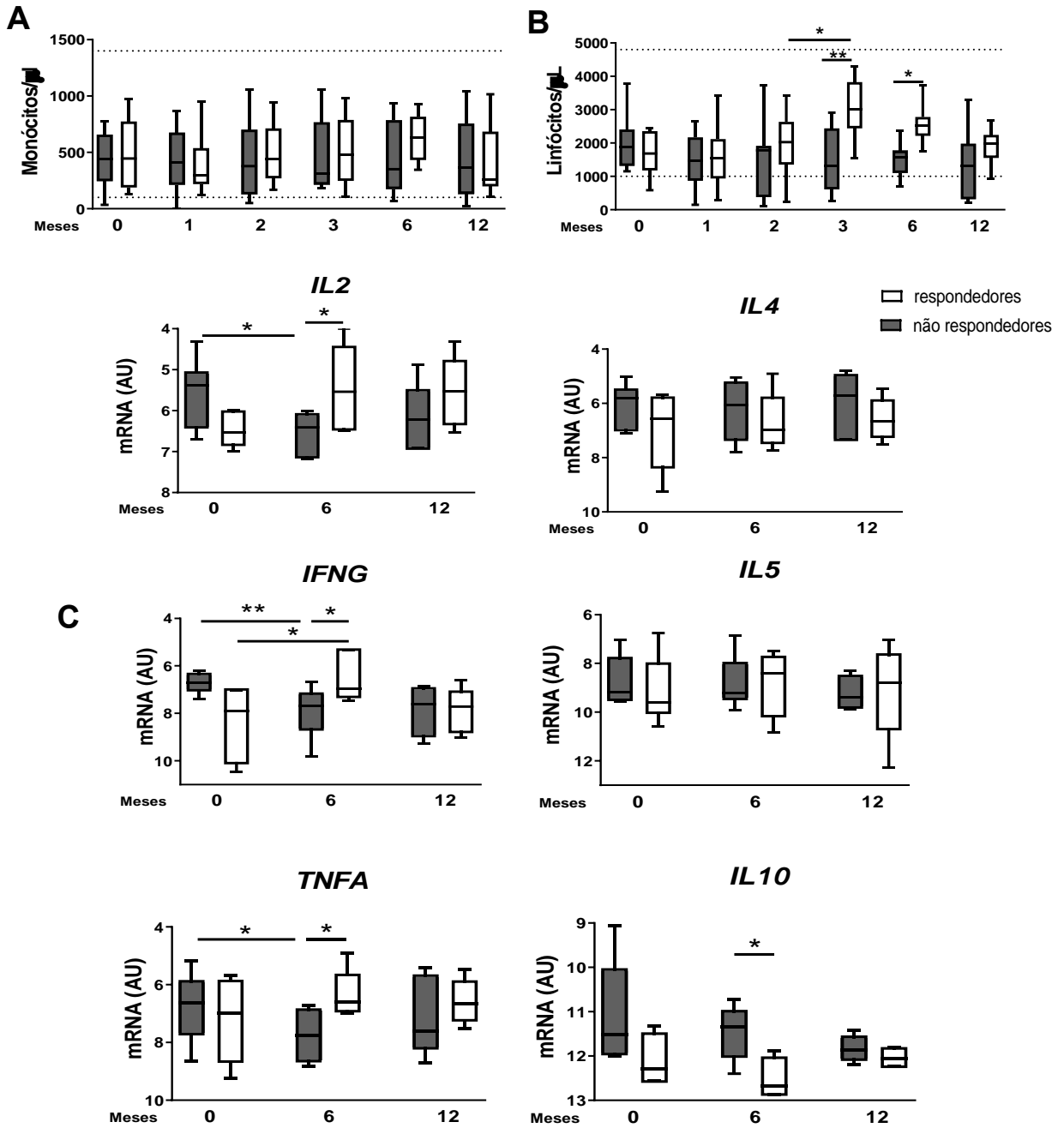
**Figura 1. Cães respondedores exibem menor carga parasitária e melhora no estadiamento clínico.** A coorte canina foi separada em cães respondedores e não respondedores em relação ao efeito da quimioterapia anti-*Leishmania*. A carga parasitária foi quantificada por qPCR no baço (A) e medula óssea (B) antes e aos 6 e 12 meses após o tratamento. O estágio clínico de cada cão foi registrado no momento do diagnóstico (T0) e após 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3), 6 (T6) e 12 (T12) meses de tratamento (C). Os dados são mostrados como média  $\pm$  DP ou em formato de caixa e bigode,  $n = 12-14$  cães / grupo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . NS: sem diferença estatística.



### 3.2 Cães respondedores exibem uma assinatura Th1

Em seguida, abordamos a resposta imune desenvolvida por GR e GNR. A contagem mediana de monócitos foi semelhante e estava dentro do intervalo de referência nos dois grupos (Figura 2A). As contagens de linfócitos, no entanto, foram alteradas em T3 e T6 (Figura 2B), não apenas aumentando de T2 para T3 dentro de GR, mas também se tornando consistentemente mais alto do que os de GNR em T3 e T6. Para explorar ainda mais, realizamos uma análise de qPCR em amostras de baço em T0, T6 e T12. O GR exibiu uma assinatura Th1, com níveis aumentados de transcritos de IL2, IFNG e TNFA em T6 (Figura 2C), embora não tenham sido encontradas diferenças na IL17 nem na IL22 (Figura 1 Suplementar). Além disso, uma redução significativa nos transcritos de IL10 de GR foi acompanhada por níveis semelhantes de citocinas IL4 e IL5 associadas a Th2 (Figura 2C), indicando uma resposta Th1 eficaz subjacente à resposta protetora. Notavelmente, esses efeitos nas transcrições puderam ser verificados em todos os cães individuais analisados (Figura 1 Suplementar). No geral, nossos dados mostraram que níveis aumentados de linfócitos no sangue periférico e uma resposta esplênica de Th1 orientam a resposta ao tratamento.

**Figura 2. Cães respondedores exibem a assinatura Th1.** O número absoluto sérico de monócitos (A) e linfócitos (B) foi quantificado de T0 até 12 meses após o tratamento. O mRNA foi isolado a partir de biópsias do baço em T0, T6 e T12. A PCR quantitativa foi realizada para IFNG, TNFA, IL2, IL4, IL5 e IL10 (C). Os dados são mostrados como média  $\pm$  DP ou em formato de caixa e bigode,  $n = 5$  a 10 cães / grupo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

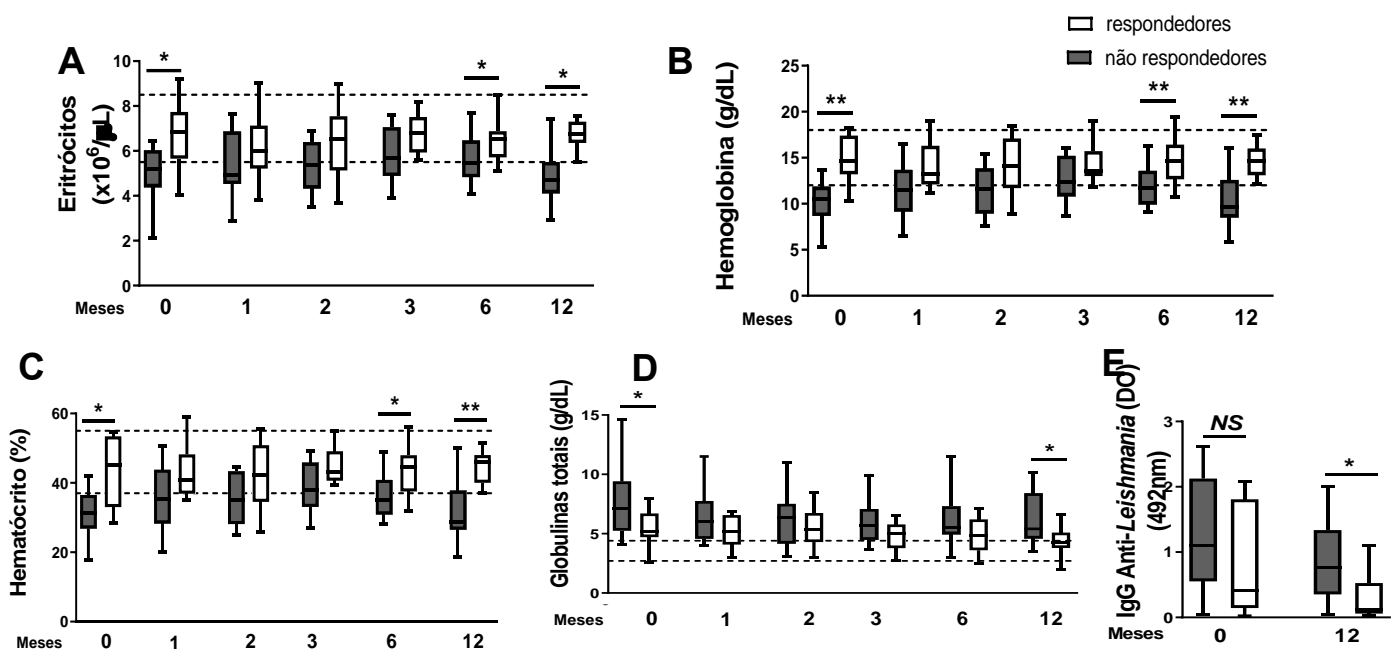


### 3.3 Cães não respondedores falham ao restaurar os parâmetros hematológicos para valores de referência normais

Em T0, os cães GR apresentaram contagens medianas de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito dentro do intervalo de referência normal, enquanto nos cães GNR esses parâmetros foram limítrofes (Figura 3A-C). No T0, 8 em 14 (57,14%) dos GNR apresentaram anemia; destes, 4 de 8 (50%) apresentaram uma contagem de reticulócitos abaixo de  $60 \times 10^3 / \text{mm}^3$  (apresentavam anemia não regenerativa). Em relação aos cães com GR, 3 em 12 (25%) eram anêmicos, sendo 2 deles com contagem de reticulócitos superior a  $60 \times 10^3 / \text{mm}^3$  (com anemia

regenerativa). No T12, 9 dos 13 (69,2%) cães GNR eram anêmicos, em comparação com nenhum dos cães GR; dentre os 9 cães, apenas um apresentou contagem de reticulócitos superior a  $60 \times 10^3/\text{mm}^3$ . Isso é altamente sugestivo de que a anemia não regenerativa realmente progrediu no grupo GNR de cães durante o ano de acompanhamento, apesar do tratamento. Os níveis totais de globulina aumentaram nos dois grupos, mas o GR apresentou um nível significativamente mais baixo (Figura 3D). Curiosamente, a diferença de globulinas não era equivalente aos títulos de IgG específicos para anti-*Leishmania*, que não podiam discriminar GR de GNR (Figura 3E).

**Figura 3. O sucesso da terapia anti-*Leishmania* está associado a uma restauração dos eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, bem como os valores totais e específicos de globulina da *Leishmania*.** O número de eritrócitos (A) e os valores de hemoglobina (B), hematócrito (C), globulinas totais (D) e IgG anti-*Leishmania* (E) foram quantificados no soro no diagnóstico (0) e após 1, 2, 3, 6 e 12 meses de tratamento anti-*Leishmania*. Os dados são mostrados em formato de caixa e bigode (n=12), cães não respondedores (n=14). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.



A coorte de cães foi monitorada durante um ano por meio de análises hematológicas e bioquímicas realizadas em um, dois, três, seis e doze meses pós-tratamento (T1, T2, T3, T6 e T12) (Figura 3A-D). Embora uma tendência para melhora hematológica tenha sido observada em todos os parâmetros até o terceiro mês de tratamento, os cães não respondedores diminuíram nos meses 6 e 12 (Figura 3A-D). Em oposição, todos os cães respondedores apresentaram números de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito dentro dos valores de referência normais após 12 meses de tratamento, exceto globulinas totais, onde 3 de 11 cães ainda apresentavam valores acima do limite superior (Figura 3A-D). Além disso, a recuperação observada de cães

respondedores foi acompanhada por uma redução significativa na IgG específica anti-*Leishmania* (Figura 3E).

Por fim, como nossos dados foram sugestivos de que o número de eritrócitos, os valores de hemoglobina e hematócrito podem ser preditivos da resposta terapêutica em um primeiro momento de avaliação de cães doentes, antes do tratamento, calculamos o risco relativo (RR) e o intervalo de confiança de 95% (CI) para determinar a probabilidade de cada um desses parâmetros estar associado à progressão do LCan após o tratamento. Foi observada uma associação significativa entre a diminuição da hemoglobina (3,14 RR com 1,14–8,7 CI), hematócrito (3,75 RR com 1,05–13,38 CI) e níveis de eritrócitos (1,82 RR com 0,88–3,73 CI) com a falha do tratamento LCan, reforçando a sua utilidade à previsão da resposta terapêutica.

### **3.4 Os parâmetros bioquímicos do soro são preditivos de lesão de órgão visceral em cães não respondedores**

Os níveis séricos de marcadores de dano hepatocelular, alanina e aspartato transaminase (Figura Suplementar S2A, B) e marcador de doença do trato biliar  $\gamma$ -glutamilttransferase (Figura Suplementar S2C), estavam dentro da faixa de referência durante o acompanhamento em ambos os grupos. No entanto, a colinesterase e a albumina, proteínas sintetizadas no fígado, foram significativamente reduzidas na GNR em T0, T6 e T12 (Figura 4A e Figura Suplementar S2D). Na GNR, enquanto os valores de ureia e creatinina estavam dentro do intervalo de referência (Figura Suplementar S2E, F), a relação proteína/creatinina urinária (UPC), um preditor de doença renal, estava elevada (Figura 4B). Essas alterações peculiares são indicativas de doença hepática e renal precoce na GNR. Os valores de hematológica, bioquímica sérica e carga parasitária dos tempos inicial e final dos cães respondedores e não respondedores ao tratamento são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores hematológicos, bioquímicos séricos, parâmetros de estresse oxidativo e carga parasitária dos tempos inicial e final dos cães respondedores e não respondedores ao tratamento. Dados em média. \* p <0,05; \*\* p <0,01.

Parâmetros/Grupos	Respondedores (R)		P (T0 vs T12)	Não respondedores (NR)		P (T0 vs T12)	VR	P (T0 R vs T0 NR)
	T0	T12		T0	T12			
<b>Hematologia</b>								
Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> /μL)	6.68	6.73	0.497	5.01	4.97	0.940	5.5-8.5	0.033
Hemoglobina (g/dL)	15.03	14.75	0.771	10.21	10.54	0.885	12-18	0.0002
Hematócrito (%)	41.82	45.12	0.689	31.2	32.78	0.641	37-55	0.0023
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)	9.6	13	0.120	8.9	8,8	0.935	6-17	0.345
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1.69	1.92	0.373	1.92	1.41	0.181	1 – 4.8	0.406
Monócitos (/mm <sup>3</sup> )	493	424	0.606	457	429	0.972	150-1,350	0.776
Reticulócitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	90	34,6	0,144	51,6	46,1	0,678	<60	0,303
<b>Bioquímica sérica</b>								
Proteínas totais (g/dL)	8.6	7.7	0.102	9	8.6	0.254	5.4-7.1	0.426
Albumina (g/dL)	2.79	3.04	0.167	2.21	2.54	0.260	2.6-3.3	0.017
Globulinas (g/dL)	5.7	4.3	0.032	6.7	6.2	0.186	2.7-4.4	0.045
Albumina/Globulina	0,5	0,8	0,0682	0,4	0,5	0,242	0,5-1,7	0,081
Cálcio (mg/dL)	11.73	10.50	0.330	10.87	10.39	0.218	9-11,3	0.064
GGT (U/L)	5.78	4.54	0.329	4.73	6.11	0.218	1-10	0.736
Creatinina (mg/dL)	1.26	1.0	0.082	1.0	1.2	0.330	0.5-1.4	0.920
Ureia (mg/dL)	43.8	37.6	0.579	36.2	22.55	0.060	21-60	0.591
Colesterol (mg/dL)	22.9	33.5	< 0.0001	20.71	28.8	0.001	31-71	0.112
Magnésio (mg/dL)	1.62	2.22	0.264	1.66	1.86	0.017	1.8-2.4	0.104
HDL (mg/dL)	57.6	145.2	< 0.0001	45.5	112.9	< 0.0001	33-120	0.062
Triglicérides (mg/dL)	75.72	73.42	0.853	72.7	100	0.029	20-112	0.333
ALT (UI/L)	51.2	66.9	0.830	42.4	66.8	0.117	21-102	0.214
FA (UI/L)	74.97	86.82	0.587	101	124.7	0.933	20-156	0.255
AST (UI/L)	23.96	32.82	0.087	40.93	32.82	0.615	23-66	0.368
Glicose (mg/dL)	93.7	90	0.472	90.8	87.5	0.617	65-118	0.497
Ferro (μg/dL)	280.07	85.29	0.094	360.4	142.2	0.075	30-180	0.149
Fósforo (mg/dL)	3.07	2.84	0.401	4.56	3.074	0.011	2.5-6.0	0.0085
Potássio (mmol/L)	13.40	13.38	0.980	14.95	14.42	0.229	12.3-15.7**	0.0023
CK (U/L)	47.08	152.39	< 0.0001	37.35	87.79	0.106	100-200**	0.504
CK-MB (U/L)	145.71	24.84	0.310	82.07	38.07	0.121	31-38.8	0.432
Colinesterase (U/L)	4022.2	4200.5	0.737	3,198	2,807	0.911	1,210-3,020	0.057
UPC	0.48	0.31	0.113	0.44	0,85	0.342	0,5 <sup>#</sup>	0.833
<b>Sorologia</b>								
ELISA (DO) – IgG Anti- <i>Leishmania</i>	1.03	0.54	0.035	1.24	0.31	0.168	0,17**	0.127
<b>Carga parasitária</b>								
Baço (Carga parasitária (log10))	3.225	1.398	< 0.0001	3.761	4.252	0.969		0.382
Medula óssea (Carga parasitária (log10))	2.580	0.408	< 0.0001	2.879	2.579	0.431		0.748

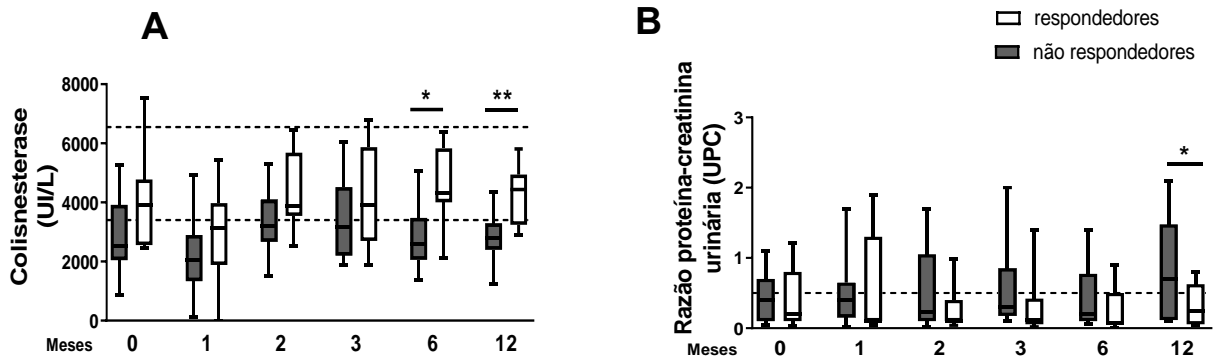
VR – Hemograma e bioquímica sérica: valores de referência. Fonte:(KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

VR - #UPC<0,5 cães saudáveis; 0,5-1,0 limítrofe; >1,0 proteinúria glomerular. Fonte: Solano-Gallego et al. [5].

T0: tempo 0 (antes do tratamento); T12: tempo 12 (12 meses após tratamento).

\*\*VR baseados nos valores dos controles negativos do estudo.

**Figura 4. Cães não respondedores desenvolvem lesões hepáticas e renais subclínicas.** Os valores séricos de colinesterase (A), razão de proteína/creatinina urinária (B) e isoenzima sérica creatina quinase MB (C) e creatina quinase (D) foram quantificados em T0, T1, T2, T3, T6 e T12. Os dados são mostrados como média ± DP ou em formato de caixa e bigode, n = 12-14 cães / grupo. \* p <0,05; \*\* p <0,01.



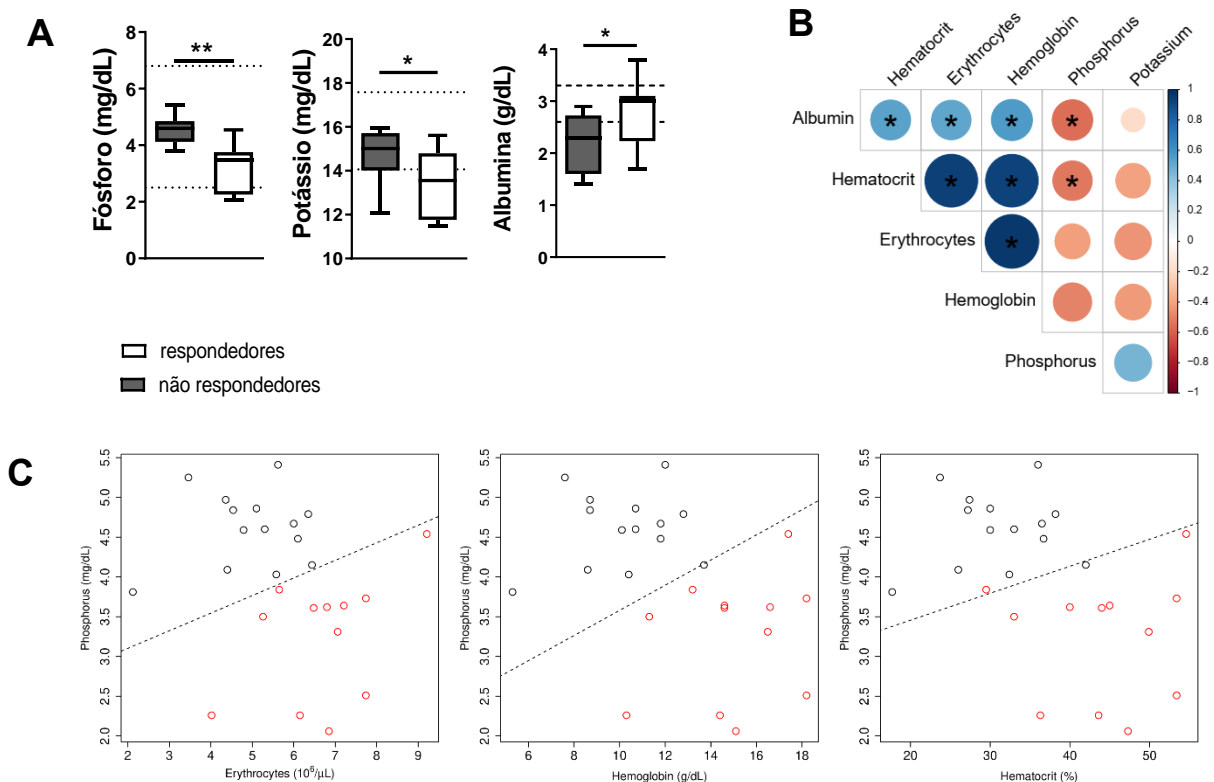
### 3.5. Desenvolvimento de um modelo matemático com valor preditivo para o sucesso da quimioterapia na LCan

Além de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito (Figura 3A-C), fósforo e, em menor grau, potássio e albumina também discriminaram significativamente GR de GNR em T0 (Figura 5A). Altos coeficientes de correlação de Spearman foram encontrados entre eritrócitos, hematócrito e hemoglobina (Figura 5B). Modelos de regressão logística com o menor critério de informação de Akaike (AIC) e maior precisão usando uma validação cruzada *leave-one-out* foram selecionados o fósforo mais uma das três variáveis altamente correlacionadas - eritrócitos, hematócrito ou hemoglobina (Figura 5C). A maior precisão foi obtida considerando fósforo e eritrócitos. Para este caso, o log (*odds*) de um tratamento bem-sucedido, usando o conjunto de dados completo, pode ser dado por:

$$\log(\text{probabilidade}) = 14,067 - 5,289 \times [\text{Fósforo}] + 1,170 \times \text{Número de eritrócitos}$$

A probabilidade é obtida aplicando a função logística:  $\exp(x) / (1 + \exp(x))$ , onde  $x$  é o log (*odds*). Notavelmente, esta fórmula permitiu discriminação de 100% entre GR e GNR, demonstrando o alto poder preditivo de nosso modelo matemático.

**Figura 5. Desenvolvimento de um modelo matemático com valor preditivo para o sucesso da quimioterapia CanL incluindo a medição dos parâmetros eritrocitários e de fósforo.** (A) Os valores séricos de fósforo, potássio e albumina foram quantificados em T0). (B) O coeficiente de correlação linear de Spearman é mostrado para os valores de albumina sérica, hematócrito, eritrócitos, hemoglobina, fósforo e potássio. (C) Gráficos de dispersão entre fósforo e hematócrito ou eritrócitos ou valores de hemoglobina no soro. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP ou em formato de gráfico de caixa e bigode. Cães respondedores (n= 12), cães não respondedores (n = 14). \* p <0,05; \*\* p <0,01.



## Discussão

Até recentemente, a maioria dos estudos de fatores prognósticos para o sucesso ou falha do tratamento na leishmaniose era restrito a humanos [33-37], e o cão infectado era visto apenas como um reservatório de protozoário. Este é um estudo longitudinal inovador de fatores prognósticos em cães infectados naturalmente com *L. infantum* em tratamento que resultou em uma clara distinção de dois perfis de cães com LCan que responderam de forma diferente à mesma terapia antiparasitária, com base na redução da carga parasitária nos tecidos. Cães com número reduzido de parasitos têm menos probabilidade de desenvolver sinais clínicos e são menos infecciosos para os vetores [5].

Estudos indicam que o sucesso da resolução das infecções por *Leishmania* depende de uma resposta caracterizada pela predominância de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , que aumentam a eficiência fagocítica e a citotoxicidade linfocitária, desencadeando uma resposta imune protetora [38, 39]. Assim, observamos que os cães respondedores exibiram uma assinatura Th1 consistente que acompanhou a redução do parasitismo após o tratamento, em oposição ao grupo não respondedor.

No presente estudo, os parâmetros de estadiamento clínico da LCan [8] e acompanhamento dos cães, como relação albumina/globulina, anemia não-regenerativa ou funções renais, foram avaliados individualmente do início ao final do estudo. No entanto, apenas no final do estudo de um ano, o resultado do tratamento permitiu a determinação de quais cães poderiam ser classificados como respondedores ou não respondedores. A evidente dicotomia entre cães GR e GNR permitiu a identificação de dois parâmetros laboratoriais preditivos de sucesso terapêutico: contagem de eritrócitos e dosagem de fósforo sérico. A anemia é comumente observada na leishmaniose humana e canina e pode ser originada da produção reduzida e/ou aumento da destruição dos eritrócitos [27, 40, 41]. Durante as doenças inflamatórias crônicas, a anemia resulta de baixos níveis circulantes de ferro, enquanto as citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$  inibem a eritropoiese, e o dano à membrana eritrocitária por agentes oxidantes encurta a vida útil dos eritrócitos [42]. Em infecções crônicas como na LCan, esses eritrócitos danificados são retidos e destruídos no baço, que aumenta de tamanho como um sinal clínico da doença. Isso é acompanhado por uma desregulação das proteínas de transporte de ferro, levando ao acúmulo de armazenamento de ferro [43, 44]. Isso explica o tipo de anemia normocítica normocrômica que a maioria dos cães apresentava no início do presente estudo, o que também demonstra que uma suplementação de ferro pode ser inadequada durante o tratamento de doenças inflamatórias, conforme já descrito na literatura [45, 46, 47]. Na doença renal crônica, que é comum na LCan, a anemia também resulta da diminuição da produção de eritropoietina no rim [8, 48]. Os rins são a principal via de excreção de fósforo e a hiperfosfatemia promove lesões renais progressivas [49], conforme descrito em cães com LCan em estágio avançado [50]. Os níveis séricos de globulina e proteínas de fase aguda, proteinúria e razão UPC são considerados biomarcadores para o monitoramento clínico de cães durante o tratamento leishmanicida e pós-tratamento [3, 17, 18, 51, 52]. No entanto, poucos estudos abordaram a identificação de fatores, a serem usados como preditores de prognóstico confiáveis, com base no desfecho (morte ou cura) após a terapia [52]. No presente estudo, cães com LCan em estadiamento moderado exibiram fósforo sérico - um marcador de insuficiência renal - dentro da faixa de referência, mas os modelos de regressão logística

indicaram claramente que as alterações de fósforo em adição aos eritrócitos eram sensíveis o suficiente para prever o sucesso ou falha da quimioterapia.

O fósforo interage com o cálcio por meio da modulação de vários hormônios e sua concentração sérica é aproximadamente inversamente relacionada [50]. No geral, os cães não respondedores de nosso estudo exibiram magnésio mais baixo, fósforo mais alto e razão Ca/P mais baixa em comparação com cães respondedores, com consequências renais demonstradas pela razão UPC elevada. Os desequilíbrios iônicos relacionados ao comprometimento renal são a base de várias manifestações clínicas; por exemplo, o magnésio é um cofator enzimático que participa de diversas reações metabólicas [40, 54], incluindo aquelas relacionadas à eritropoiese [55, 56].

Os níveis séricos de colinesterase e albumina normalizaram em cães respondedores após seis meses de terapia, ao contrário dos não respondedores. Como o fígado é um local de atividade de *L. infantum* [57], essa interferência discreta com a função sintética hepática poderia explicar nossos achados em cães não respondedores. Aqui, a ureia e a creatinina séricas estavam dentro dos valores de referência em ambos os grupos de cães. Isso corrobora os dados da literatura que mostram que a azotemia é um achado incomum, apesar da elevada frequência de patologias renais na LCan [58]. A creatinina é um subproduto da CK, cujos níveis são reduzidos em cães com LCan [59]; portanto, sugerimos que esse viés do diagnóstico de azotemia no LCan avançado resulta da subconcentração de creatinina e pode levar a subdiagnóstico de doença renal. Tem sido enfatizado na literatura que a infecção ativa por *L. infantum* e progressão do LCan relaciona-se com a doença mediada por imunocomplexos [60], que desempenha um papel importante na fisiopatologia de diversas manifestações clínicas, incluindo anemia hemolítica imunomediadas, lesões glomerulares e insuficiência renal [38, 61]. Nesse sentido, a prednisolona foi escolhida como uma droga anti-inflamatória no presente estudo durante um curto prazo em todos os cães para minimizar a formação e circulação de imunocomplexos solúveis e, desta maneira, reduzir a inflamação por meio de um efeito inibidor na ativação do complemento [62, 63]. Os benefícios da terapia com glicocorticoides no tratamento da LCan foram descritos anteriormente [20, 25, 26]. É importante ressaltar que vários estudos têm mostrado que a administração oral de glicocorticoides de curto ou longo prazo em cães não induz alterações significativas nos diversos parâmetros hematológicos e bioquímicos [64, 65, 66, 67]. O curso de quatro semanas de prednisolona não pareceu ter interferido com os biomarcadores avaliados neste documento, pois as avaliações em T1 não se comportaram de maneira diferente daquelas observadas em pontos de acompanhamento subsequentes, conforme demonstrado na Figura 2, Figura 3 e Figura 4. Após a corticoterapia com doses anti-

inflamatórias, uma discreta elevação nas enzimas hepáticas é esperada em cães, conforme previamente descrito [66, 68].

Ao todo, desenvolvemos uma fórmula matemática usando eritrócitos e fósforo como marcadores para um prognóstico de sucesso da terapia antiparasitária no momento do primeiro diagnóstico. No entanto, o estudo apresenta a reduzida coorte estudada, e o uso de antiparasitários de segunda linha, dadas as restrições para abordagens terapêuticas da LCan no Brasil, como principais limitações. Por se tratar de um estudo clínico de longa duração, resultou em um pequeno número de cães que foram acompanhados até a última avaliação. Apesar disso, os dados obtidos foram tão consistentes que permitiram a criação da fórmula, que pode ser um guia inicial para novos estudos com amostras maiores e diferentes métodos de validação cruzada e em coortes tratadas com medicamentos de primeira linha. Tomados em conjunto, esses resultados são altamente encorajadores e podem representar um novo paradigma para o atendimento clínico, permitindo uma interferência terapêutica precoce a partir de um diagnóstico aprimorado.

## Referências

1. Seva, A.P.; Ovallos, F.G.; Amaku, M.; Carrillo, E.; Moreno, J.; Galati, E.A.B.; Lopes, E.G.; Soares, R.M.; Ferreira, F. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS ONE* 2016, 11, e0160058.
2. Lippi, I.; Guidi, G.; Marchetti, V.; Tognetti, R.; Meucci, V. Prognostic role of the product of serum calcium and phosphorus concentrations in dogs with chronic kidney disease: 31 cases (2008–2010). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2014, 245, 1135–1140.
3. Paltrinieri, S.; Gradoni, L.; Roura, X.; Zatelli, A.; Zini, E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet. Clin. Pathol.* 2016, 45, 552–578.
4. WHO. Leishmaniasis. Available online: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (accessed on 20 November 2019).
5. Magalhães-Junior, J.T.; Feitosa, T.; Porfirio-Passos, G.; Farias, D.; Roberto, C.; Barrouin-Melo, S.M. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. *Vet. Parasitol.* 2016, 223, 120–126.
6. Borja, L.S.; Sousa, O.M.F.; Solca, M.D.S.; Bastos, L.A.; Bordoni, M.; Magalhães, J.T.; Lorangeira, D.F.; Barrouin-Melo, S.M.; Fraga, D.B.M.; Veras, P.S.T. Parasite load in the blood

and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet. Parasitol.* 2016, 132, 83–87.

7. Torrecilha, R.B.P.; Utsunomiya, Y.T.; Bosco, A.M.; Almeida, B.F.; Pereira, P.P.; Narciso, L.G.; Pereira, D.C.M.; Baptistioli, L.; Calvo-bado, L.; Courtenay, O. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev. Vet. Med.* 2016, 132, 83–87.

8. Solano-Gallego, L.; Miró, G.; Koutinas, A.; Cardoso, L.; Pennisi, M.G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. The LeishVet Group LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites Vectors* 2011, 4, 86.

9. Oliva, G.; Roura, X.; Crotti, A.; Maroli, M.; Castagnaro, M.; Gradoni, L.; Lubas, G.; Paltrinieri, S.; Zatelli, A.; Zini, E. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2010, 236, 1192–1198.

10. Manna, L.; Corso, R.; Galiero, G.; Cerrone, A.; Muzj, P.; Gravino, A.E. Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites Vectors* 2015, 8, 289.

11. Marcondes, M.; Day, M.J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Res. Vet. Sci.* 2019, 123, 261–272.

12. Nogueira, S.; Avino, V.C.; Galvis-Ovallos, F.; Pereira-Chioccola, V.L.; Antonio, M.; Moreira, B.; Paula, A.; Lopes, P.; Molla, L.M.; Menz, I. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites Vectors* 2019, 12, 79.

13. da Silva, S.; Amorim, I.F.G.; Ribeiro, R.R.; Azevedo, E.G.; Demicheli, C.; Melo, M.N.; Tafuri, W.L.; Gontijo, N.F.; Michalick, M.S.M.; Frézard, F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 2858–2867.

14. Nery, G.; Becerra, D.R.D.; Borja, L.S.; Magalhães-Junior, J.T.; Souza, B.M.P.S.; Franke, C.R.; Veras, P.S.T.; Larangeira, D.F.; Barrouin-Melo, S.M. Evaluation of parasite infectivity for *Lutzomyia longipalpis* by xenodiagnosis in dogs treated for natural visceral leishmaniasis. *Braz. J. Vet. Res.* 2017, 37, 701–707.

15. Ponte-Sucre, A.; Gamarro, F.; Dujardin, J.; Barrett, M.P.; Garci, R.; Pountain, A.W.; Mwenechanya, R.; Papadopoulou, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017, 11, e0006052.

16. Baxarias, M.; Álvarez-Fernández, A.; Martínez-Orellana, P.; Montserrat-Sangrà, S.; Ordeix, L.; Rojas, A.; Nachum-Biala, Y.; Baneth, G.; Solano-Gallego, L. Does co-infection with vector-borne pathogens play a role in clinical canine leishmaniosis? *Parasites Vectors* 2018, 11, 135.
17. Roura, X.; Fondati, A.; Lubas, G.; Gradoni, L.; Maroli, M.; Oliva, G.; Paltrinieri, S.; Zatelli, A.; Zini, E. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *Vet. J.* 2013, 198, 43–47.
18. Maia, C.; Campino, L. Biomarkers Associated with *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018, 8, 302.
19. Sellon, R.K.; Menard, M.M.; Meuten, D.J.; Lengerich, E.J.; Steurer, F.J.; Breitschwerdt, E.B. Endemic Visceral Leishmaniasis in a Dog from Texas. *J. Vet. Intern. Med.* 1993, 7, 16–19.
20. Ciaramella, P. Canine Leishmaniasis: Therapeutic Aspects \*. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 2003, 25, 370–375.
21. Noli, C.; Auxilia, S.T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: *Vet. Dermatol.* 2005, 16, 213–232.
22. Pennisi, M.G.; De Majo, M.; Masucci, M.; Britti, D.; Vitale, F.; Del Maso, R. Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Vet. Rec.* 2005, 156, 346–349.
23. Barrouin-Melo, S.M.; Larangeira, D.F.; de Andrade Filho, F.A.; Trigo, J.; Julião, F.S.; Franke, C.R.; Palis Aguiar, P.H.; Conrado dos-Santos, W.L.; Pontes-de-Carvalho, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet. J.* 2006, 171, 331–339.
24. Paparcone, R.; Fiorentino, E.; Cappiello, S.; Gizzarelli, M.; Gradoni, L.; Oliva, G.; Manzillo, V.F. Sternal aspiration of bone marrow in dogs: A practical approach for canine leishmaniasis diagnosis and monitoring. *J. Vet. Med.* 2013, 2013, 217314.
25. Adamama-Moraitou, K.K.; Saridomichelakis, M.N.; Polizopoulou, Z.; Kritsepi, M.; Tsompanakou, A.; Koutinas, A.F. Short-term exogenous glucocorticosteroidal effect on iron and copper status in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Can. J. Vet. Res.* 2005, 69, 287–292.

26. Cortese, L.; Pelagalli, A.; Piantedosi, D.; Mastellone, V.; Di Loria, A.; Lombardi, P.; Ciaramella, P.; Avallone, L. The effects of prednisone on haemostasis in leishmaniotic dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J.* 2008, 177, 405–410.
27. Harvey, J.W.; Stevens, A.; Lowe, J.S.; Scott, I. *Veterinary Hematology*; Elsevier: St. Louis, United States, 2012; ISBN 9781437701739.
28. Costa, I.; Carvalho, F.; Magalhães, T.; Guedes De Pinho, P.; Silvestre, R.; Dinis-Oliveira, R.J. Promising blood-derived biomarkers for estimation of the postmortem interval. *Toxicol. Res. (Camb)* 2015, 4, 1443-1452.
29. Silvestre, R.; Santarém, N.; Cunha, J.; Cardoso, L.; Nieto, J.; Carrillo, E.; Moreno, J.; Cordeiro-da-Silva, A. Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. *Vet. Parasitol.* 2008, 158, 23–30.
30. Rolão, N.; Cortes, S.; Rodrigues, O.R.; Campino, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by Real-Time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction—Enzyme-linked immunosorbent assay real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction—Enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Parasitol.* 2004, 90, 1150–1154.
31. R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria. Available online: <https://www.r-project.org/> (accessed on 20 November 2019).
32. Kosmidis I Bias Reduction in Binary-Response Generalized Linear Models\_. R Package Version 0.6.2. Available online: <https://cran.r-project.org/package=brglm%3E> (accessed on 20 November 2019).
33. Tourinho, B.D.; Amâncio, F.F.; Ferraz, M.L.; Carneiro, M. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in patients treated with liposomal amphotericin B in an endemic state in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2017, 111, 163–171.
34. da Silva, T.A.M.; Morais, M.H.F.; Lopes, H.M.O.R.; Gonçalves, S.A.; Magalhães, F.D.C.; Amâncio, F.F.; Antunes, C.M.F.; Carneiro, M. Prognostic factors associated with death from visceral leishmaniasis: A case control study in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2020, 7, 346–354.
35. Belo, V.S.; Struchiner, C.J.; Barbosa, D.S.; Nascimento, B.W.L.; Horta, M.A.P.; da Silva, E.S.; Werneck, G.L. Risk Factors for Adverse Prognosis and Death in American Visceral Leishmaniasis: A Meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, 8, e2982.

36. Coura-Vital, W.; de Araújo, V.E.M.; Reis, I.A.; Amancio, F.F.; Reis, A.B.; Carneiro, M. Prognostic Factors and Scoring System for Death from Visceral Leishmaniasis: An Historical Cohort Study in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, 8, e3374.
37. Costa, D.L.; Rocha, R.L.; de Brito Ferreira Chaves, E.; de Vasconcelos Batista, V.G.; Costa, H.L.; Nery Costa, C.H. Predicting death from kala-azar: Construction, development, and validation of a score set and accompanying software. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2016, 49, 728–740.
38. Carrillo, E.; Moreno, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009, 128, 67–70.
39. Moreno, J.; Alvar, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002, 18, 399–405.
40. Varma, N.; Naseem, S. Hematologic changes in visceral Leishmaniasis/Kala Azar. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 2010, 26, 78–82.
41. De Pinho, F.A.; Vendrame, C.M.V.; MacIel, B.L.L.; Dos Santos Silva, L.; Miyashiro, S.I.; Jerônimo, S.M.B.; Goto, H. Association between insulin-like growth factor-i levels and the disease progression and anemia in visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2019, 4, 808–815.
42. Madu, A.J.; Ughasoro, M.D. Anaemia of Chronic Disease: An In-Depth Review. *Med. Princ. Pract.* 2017, 26, 1–9.
43. Zaidi, A.; Singh, K.P.; Ali, V. *Leishmania* and its quest for iron: An update and overview. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2017, 211, 15–25.
44. Laranjeira-Silva, M.F.; Hamza, I.; Pérez-Victoria, J.M. Iron and Heme Metabolism at the *Leishmania*–Host Interface. *Trends Parasitol.* 2020, 36, 279–289.
45. Poggiali, E.; Migone De Amicis, M.; Motta, I. Anemia of chronic disease: A unique defect of iron recycling for many different chronic diseases. *Eur. J. Intern. Med.* 2014, 25, 12–17.
46. Clark, M.A.; Goheen, M.M.; Fulford, A.; Prentice, A.M.; Elnagheeb, M.A.; Patel, J.; Fisher, N.; Taylor, S.M.; Kasthuri, R.S.; Cerami, C. Host iron status and iron supplementation mediate susceptibility to erythrocytic stage *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* 2014, 5, 4446.
47. Pieracci, F.M.; Barie, P.S. Iron and the risk of infection. *Surg. Infect. (Larchmt)* 2005, 6, 41–46.

48. Chen, T.K.; Knicely, D.H.; Grams, M.E. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *J. Am. Med. Assoc.* 2019, 13, 1294–1304.
49. Martorelli, C.R.; Kogika, M.M.; Chacar, F.C.; Caragelasco, D.S.; de Campos Fonseca Pinto, A.C.B.; Lorigados, C.A.B.; Andrade, L.C. Urinary fractional excretion of phosphorus in dogs with spontaneous chronic kidney disease. *Vet. Sci.* 2017, 4, 67.
50. Cortadellas, O.; Fernández-del Palacio, M.J.; Talavera, J.; Bayón, A. Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniosis at different stages of chronic kidney disease. *Vet. Rec.* 2009, 164, 487–490.
51. Rougier, S.; Housseine, L.; Delaunay, P.; Michel, G.; Marty, P. One-year clinical and parasitological followup of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 2012, 186, 245–253.
52. Solano-Gallego, L.; Di Filippo, L.; Ordeix, L.; Planellas, M.; Roura, X.; Altet, L.; Martínezorellana, P. Early reduction of *Leishmania infantum*—Specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease. *Parasites Vectors* 2016, 9, 235.
53. Zanette, M.F.; de Lima, V.M.F.; Laurenti, M.D.; Rossi, C.N.; Vides, J.P.; da Costa Vieira, R.F.; Biondo, A.W.; Marcondes, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2014, 47, 105–107.
54. Kaneko, J.; Harvey, J.; Bruss, M. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA 2008; ISBN 9780123704917.
55. Elin, R.J.; Utter, A.; Tan, H.K.; Corash, L. Effect of magnesium deficiency on erythrocyte aging in rats. *Am. J. Pathol.* 1980, 100, 765–778.
56. Nicolato, R.D.C.; De Abreu, R.T.; Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.D.O.; Reis, L.E.S.; Carvalho, M.D.G.; Carneiro, C.M.; Giunchetti, R.C.; Bouillet, L.E.M.; Lemos, D.S.; et al. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS ONE* 2013, 8, e82947.
57. Tonin, A.A.; Calado, A.M.C.; Bottari, N.B.; Dalenogare, D.; Thomé, G.R.; Duarte, T.; Duarte, M.M.M.F.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R.C.; Alves, L.C.; et al. Novel markers of inflammatory response and hepatic dysfunction in canine leishmaniasis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2016, 44, 61–64.

58. Meléndez-Lazo, A.; Ordeix, L.; Planellas, M.; Pastor, J.; Solano-Gallego, L. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Res. Vet. Sci.* 2018, 117, 18–27.
59. Paltrinieri, S.; Pintore, L.; Balducci, F.; Giordano, A.; Costabile, A.; Bernardini, M. Serum creatine kinase isoenzymes and macroenzymes in dogs with different neurologic diseases. *Vet. Clin. Pathol.* 2017, 46, 91–99.
60. Hosein, S.; Blake, D.P.; Solano-Gallego, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology* 2016, 144, 95–115.
61. Solano-Gallego, L.; Koutinas, A.; Miró, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M.G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 2009, 165, 1–18.
62. Whitley, N.T.; Day, M.J. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. *J. Small Anim. Pract.* 2011, 52, 70–85.
63. Miller, E. Immunosuppressive Therapy in the Treatment of Immune-mediated Disease. *J. Vet. Intern. Med.* 1992, 6, 206–213.
64. Moore, G.E.; Mahaffey, E.A.; Hoenig, M. Hematologic and serum biochemical effects of long-term administration of anti-inflammatory doses of prednisone in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1992, 53, 1033–1037.
65. Muñoz, J.; Soblechero, P.; Duque, F.J.; Macías-García, B.; Ruiz, P.; Zaragoza, C.; Barrera, R. Effects of Oral Prednisone Administration on Serum Cystatin C in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2017, 31, 1765–1770.
66. Masters, A.K.; Berger, D.J.; Ware, W.A.; Langenfeld, N.R.; Coetzee, J.P.M.; Ward, J.L. Effects of short-term anti-inflammatory glucocorticoid treatment on clinicopathologic, echocardiographic, and hemodynamic variables in systemically healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2017, 79, 1–13.
67. Tinklenberg, R.L.; Murphy, S.D.; Mochel, J.P.; Seo, Y.-J.; Mahaffey, A.L.; Yan, Y.; Ward, J.L. Evaluation of dose-response effects of short-term oral prednisone administration on clinicopathologic and hemodynamic variables in healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2020, 81, 317–325.

68. Whittemore, J.C.; Mooney, A.P.; Price, J.M.; Thomason, J. Clinical, clinicopathologic, and gastrointestinal changes from aspirin, prednisone, or combination treatment in healthy research dogs: A double-blind randomized trial. *J. Vet. Intern. Med.* 2019, 33, 1977–1987.



Article

# Mathematical Modelling Using Predictive Biomarkers for the Outcome of Canine Leishmaniasis upon Chemotherapy

Rafaela de Sousa Gonçalves <sup>1,2,3</sup>, Flaviane Alves de Pinho <sup>1,4</sup>, Ricardo Jorge Dinis-Oliveira <sup>5,6,7</sup>, Rui Azevedo <sup>6</sup>, Joana Gaifem <sup>2,3</sup>, Daniela Farias Larangeira <sup>1,4</sup>, Eduardo Milton Ramos-Sanchez <sup>8,9</sup>, Hiro Goto <sup>8,10</sup>, Ricardo Silvestre <sup>2,3,\*</sup>,† and Stella Maria Barrouin-Melo <sup>1,4,\*</sup>,†

<sup>1</sup> Laboratory of Veterinary Infectious Diseases, Teaching Hospital of Veterinary Medicine, Federal University of Bahia, Salvador 40170-110, BA, Brazil; rdsgon@gmail.com (R.d.S.G.); flaviane.alves@ufba.br (F.A.d.P.); daniela.larangeira@ufba.br (D.F.L.)

<sup>2</sup> Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine, University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal; joana.f.gaifem@gmail.com

<sup>3</sup> ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, 4710-057 Braga/Guimarães, Portugal

<sup>4</sup> Department of Veterinary Anatomy, Pathology and Clinics, School of Veterinary Medicine and Zootechny, Federal University of Bahia, Salvador 40170-110, BA, Brazil

<sup>5</sup> Department of Public Health and Forensic Sciences, and Medical Education, Faculty of Medicine, University of Porto, 4200-319 Porto, Portugal; ricardinis@sapo.pt

<sup>6</sup> Department of Sciences, IINFACTS—Institute of Research and Advanced Training in Health Sciences and Technologies, University Institute of Health Sciences (IUCS), CESPU, CRL, 4585-116 Gandra, Portugal; rui.azevedo@iucs.cespu.pt

<sup>7</sup> UCIBIO-REQUIMTE, Laboratory of Toxicology, Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, 4050-313 Porto, Portugal (R.J.D.-O.)

<sup>8</sup> Laboratory of Seroepidemiology and Immunobiology, Institute of Tropical Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Sao Paulo 05403-000, SP, Brazil; eduardors22@hotmail.com (E.M.R.-S.); hgoto@usp.br (H.G.)

<sup>9</sup> Departamento de Salud Publica, Facultad de Ciencias de La Salud, Universidad Nacional Toribio Rodriguez de Mendoza de Amazonas, Chachapoyas 01000, Peru

<sup>10</sup> Department of Preventive Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

\* Correspondence: ricardosilvestre@med.uminho.pt (R.S.); barrouin@ufba.br (S.M.B.-M.); Tel.: +35-12-5360-4811 (R.S.); +55-71-3283-6754 (S.M.B.-M.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 20 March 2020; Accepted: 12 May 2020; Published: 15 May 2020



**Abstract:** Prediction parameters of possible outcomes of canine leishmaniasis (CanL) therapy might help with therapeutic decisions and animal health care. Here, we aimed to develop a diagnostic method with predictive value by analyzing two groups of dogs with CanL, those that exhibited a decrease in parasite load upon antiparasitic treatment (group: responders) and those that maintained high parasite load despite the treatment (group: non-responders). The parameters analyzed were parasitic load determined by q-PCR, hemogram, serum biochemistry and immune system-related gene expression signature. A mathematical model was applied to the analysis of these parameters to predict how efficient their response to therapy would be. Responder dogs restored hematological and biochemical parameters to the reference values and exhibited a Th1 cell activation profile with a linear tendency to reach mild clinical alteration stages. Differently, non-responders developed a mixed Th1/Th2 response and exhibited markers of liver and kidney injury. Erythrocyte counts and serum phosphorus were identified as predictive markers of therapeutic response at an early period of assessment of CanL. The results presented in this study are highly encouraging and may

represent a new paradigm for future assistance to clinicians to interfere precociously in the therapeutic approach, with a more precise definition in the patient's prognosis.

**Keywords:** mathematical model; treatment; hematological parameters; biochemical parameters; *Leishmania*

---

## 1. Introduction

Canine leishmaniasis (CanL) is a severe disease caused by the protozoa *Leishmania infantum* [1–3]. As a zoonotic infection, *L. infantum* is a major health concern, since it also causes human visceral leishmaniasis, a neglected tropical disease, in the Americas, Europe, North Africa, the Middle East and China [4]. Dogs are susceptible to the development of high parasitic loads, playing a key role in the transmission cycle of *L. infantum* via phlebotomine sand flies in endemic areas [5,6]. Higher parasite loads in dogs are related to more severe clinical disease [7] and higher infectiousness to sand flies [5]. As full-blown disease is associated with active infection [8], efficacy of CanL treatment should be primarily centered in its capability of reducing *L. infantum* load.

Treatment of CanL is a challenge for veterinary practitioners regarding anti-parasitological efficacy, adverse effects and cost. Current leishmanicidal drugs, such as antimonials, miltefosine and allopurinol, can clinically cure dogs or temporarily improve clinical signs, but no evidence of efficacy in terms of a parasitological cure exists for any of them [8,9]. Consequently, clinical recurrences associated with high parasite loads in a number of treated dogs are frequent at diverse time intervals post treatment [10]. In Brazil, where most of the South American cases of *L. infantum* infection occur, the use of antimonials for canine treatment is prohibited [11].

The success of some antileishmanial protocols in reducing *L. infantum* load and blocking parasite transmission to phlebotomine vectors have been evidenced by xenodiagnoses [12–14]. However, failure of anti-*Leishmania* therapy depends on drug pharmacodynamic effects, parasite's inherent virulence or drug resistance development and host's immune and nutritional status, or co-infections, which contribute decisively to the recurrence [15,16]. Prognosis of response to treatment largely depends on the severity of the visceral disease, as determined by the clinicopathological alterations, particularly those related to renal function [17,18].

Because dogs respond differently to anti-parasite treatments and there are still no predictive tools to discriminate dogs that respond to therapy from those that maintain high parasitic loads despite treatment, we aimed at devoting the present study to this aspect. This study was a retrospective longitudinal analysis of parasitological, biochemical and hematological parameters in a cohort of dogs treated for CanL with second-line antileishmanial drugs, as reported in the literature [8,9,19–22]. The study's objective was to identify biomarkers and to develop a prototype mathematical model with predictive value to estimate the success of a leishmanicidal therapy as a tool for improved diagnosis and treatment monitoring.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Ethics Approval

This work was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Bahia, Brazil (CEUA-UFBA, n. 19/2011), substantiated in the bioethical principles of animal experimentation. All procedures were followed in accordance with the guidelines of the Brazilian Council of Animal Experimentation (CONCEA—Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) and strictly followed the Brazilian law for "Procedures for the Scientific Use of Animals" (11.794/2008). All manipulation in dogs, whether invasive or non-invasive, was performed or monitored by veterinarians. The group of non-responder dogs was designed based on the parasitic load whose

quantitative test was performed at the end of the study. Therefore, throughout the course of the study, dogs that developed other diseases or acquired co-infections were removed to receive proper additional treatment.

## 2.2. Animals and Sampling

A one-year longitudinal analysis of hematological and biochemical parameters was conducted in 26 dogs, naturally infected by *L. infantum* in the state of Bahia in Brazil, submitted to leishmanicidal treatment. The inclusion criteria were confirmed infection with *Leishmania* spp. via parasitological and/or molecular techniques, and consent of the guardians for the treatment with the multi-drug antiparasitic regimen (metronidazole + ketoconazole + allopurinol). The coexistence of other diseases or co-infections and terminal CanL were the exclusion criteria in the beginning and at any other time of examination in the course of the follow-up. Dogs were evaluated at six different time points during the year. The time 0 (T0) consisted of the moment in which the dogs arrived at the Zoonotic Leishmaniasis Outpatient Clinic at the Teaching Hospital of Veterinary Medicine of the Federal University of Bahia (ALZ-UFBA) for diagnosis and first clinical care. Dogs were evaluated monthly during the first three months (T1, T2, T3), and then at the sixth (T6) and twelfth month (T12) post-treatment. At each evaluation, blood was collected from the jugular or cephalic vein and stored in EDTA tubes (BD Vacutainer; Becton, Dickinson) for hemogram and search for hematozoa. Blood was also collected into EDTA-free tubes (BD Vacutainer; Becton, Dickinson) for the determination of serological and biochemical parameters. Urine was collected by cystocentesis (in females) and urethral catheterization (in males) for urinalysis and urinary protein-creatinine ratio (UPC). For the collection of bone marrow and spleen samples by aspiration biopsy (performed at T0, T6 and T12), 20 mL syringes and needles 40 × 12 mm and 40 × 16 mm were used respectively, inserted in an anatomic-topographic region of the spleen [23] and sternum [24], with previous local antiseptics and mild sedation with acepromazine (0.02 mg/kg).

## 2.3. Clinical Evaluation and Staging

Dogs were clinically evaluated for the presence or absence of CanL-compatible clinical signs and definition of clinical staging, as determined by the LeishVet Group guidelines [8]. Weight loss, appetite alterations, facies, mucosal staining, dermatopathies (ulcers, cutaneous vasculitis, onychogryphosis, desquamation, alopecia, crusts, hyperkeratosis, depigmentation of snout, nodule), lymphadenopathy, ophthalmopathy, presence or absence of fever, diarrhea, epistaxis and enlargement of the spleen by palpation were assessed. Based on clinical and laboratory parameters, dogs were categorized in clinical staging I (mild disease), II (moderate disease), III (severe disease) or IV (very severe to terminal disease).

## 2.4. Anti-Leishmania Chemotherapy

Antiparasitic treatment consisted in the administration of metronidazole (25 mg/kg/twice daily) for 30 days associated to ketoconazole (10 mg/kg/once a day) for 40 days, followed by a maintenance treatment with allopurinol (10 mg/kg/twice daily) during at least one year. Prednisolone was given (beginning with 0.5 mg/kg/twice daily) for 30 days (including gradual withdrawal) [20,25,26] to minimize systemic immune complex formation, thus indirectly to prevent kidney injury during the four-week initial course of treatment with anti-leishmanial drugs. The multi-drug therapeutic regimen for CanL used in the present study has been previously described [14].

## 2.5. Hematological and Biochemical Parameters

Hemograms, characterization of blood cell morphology and search for hematozoa infection were performed as described [27]. The following biochemical parameters were measured: enzymes (alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), creatine kinase (CK) and its isoenzyme creatine kinase MB (CK-MB), pseudocholinesterase and gamma-glutamyl transferase (GGT) (Cormay, Łomianki, Poland)), protein (albumin and total protein (Cormay, Łomianki, Poland)),

substrates (creatinine, urea) and electrolytes (calcium, phosphorus and magnesium (Spinreact, Barcelona, Spain)). The urinary protein-creatinine (UPC) and serum calcium/phosphorus ratio were also quantified. All variables were measured in the automatic (Prestige 24i, Tokyo Japan) and semi-automatic (BioPlus-200, São Paulo Brazil) biochemical analyzer, as described [28].

#### 2.6. Quantification of Total Globulin and Specific Anti-*Leishmania* Antibodies

For the quantification of total globulins, total protein values were subtracted from albumin values. Specific anti-*Leishmania* IgG antibodies were quantified in the sera as previously described [29], with minor modifications. Ninety-six-well plates (BioLegend, San Diego USA) were coated with 10 µg/mL of *L. infantum* soluble promastigote antigens. After washing with 3% PBS-low-fat-milk and 0.05% PBS-Tween (PBS-T), 100 µL/well of canine serum diluted 1:50,000 in PBS-T was added in duplicate and incubated at 30 min at 37 °C. The reaction was completed by adding the anti-dog IgG-HRP diluted at 1:5000 (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) for 30 min at 37 °C, and further incubation with 0.5 mg/mL of o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma, Darmstadt Germany) for 10 min. The reaction was stopped using 50 µL/well of 3 M HCl. Plates were read at 492 nm (Synergy, Biotek, Tokyo Japan).

#### 2.7. Parasitic Load

DNA of the collected aspirated bone marrow and spleen at T0, T6 and T12 was extracted using the commercial kit PureLink Genomic DNA<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad USA) following the manufacturer's recommendations. The quality and concentration of the DNA in each eluate were evaluated in the L-QUANT spectrophotometer (Loccus, São Paulo Brazil). For the quantification of *L. infantum* DNA in the spleen and bone marrow samples, qPCR assays were performed using the protocol described by Rolão et al. [30], with some modifications. The primers 5'-GGTTAGCCGATGGTGGTCTT-3' (forward), 5'-GCTATATCATATGTCCAAGCACTTACCT3' (reverse) and the probe TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems Foster City USA) (5'- ACCACCTAAGGTCAACCC-3') were used. The final reaction volume (25 µL) consisted of 4 µL of DNA, standardized at the concentration of 20 ng/µL, 12.5 mL of Mastermix Universal<sup>®</sup> (Life Technology Corporation, Carlsbad USA), 5 µM of each primer and 10 µM of the probe TaqMan. qPCR was run at 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. All samples were analyzed in duplicate. Reactions were performed on the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technology Corporation Carlsbad USA).

#### 2.8. Quantitative PCR

Splenic mRNA expression of cytokines *IFN-γ*, *IL-2*, *TNF-α*, *IL-17A*, *IL-22*, *IL-4*, *IL-5* and *IL-10* was determined using real time PCR. Spleen fragments were macerated for total RNA extraction using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad USA), as recommended by the manufacturer. RNA concentration was determined by OD260 measurement using a L-quant 1.0 spectrophotometer (Loccus<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil). cDNA synthesis was performed using 1 µg of total RNA plus 10 µL of High-Capacity cDNA Reverse Transcription master mix (Applied Biosystems, Foster City USA), according to the manufacturer instructions. Real-Time quantitative PCR (qRT-PCR) reactions were run for each sample on a Bio-Rad CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler (Bio-rad Berkeley USA). Primer sequences were obtained from IDT (Lovaina, Belgium) and thoroughly tested. Specific oligonucleotides are: *IL2* (forward) CCCAAGAAGGCCACAGAATTTA, (reverse) TCCTTGGTGTCTGTCAAGTGAA; *IL4* (forward) CTAGCACTCACCAGCACCTT, (reverse) CACGAGTCGTTTCTCGCTGT; *IL5* (forward) GGCGATGGGAACCTGATGAT, (reverse) CGTGGGCAGTTTGGTCTTC; *IL10* (forward) CAAGCCCTGTCCGAGATGAT, (reverse) AGAAATCCGGTGACAGCGTCG; *IFNG* (forward) TCAAATTCCTGTGAACGATCTGC, (reverse) TTATTTCGATGCTCTGCGGC; *TNFA* (forward) CTCCAATAATCAGCCCTCTTG, (reverse) GGGTTTGCTACAACATGAGCTACT; *GAPDH* (forward) GCTGGTGTGCTGATGTTGTGGAG, (reverse) CAGCAGAAGGAGCAGAGATGATGA. The RT product was expanded using the NZYSpeedy qPCR Green Master Mix kit (NZYTech, Lisbon Portugal)

and results were normalized to the expression of the housekeeping gene Gapdh. After amplification, cycle threshold-values (Ct-values) were calculated for all samples and gene expression changes were analyzed in the CFX Manager Software (Bio-Rad) and represented as arbitrary units (AU).

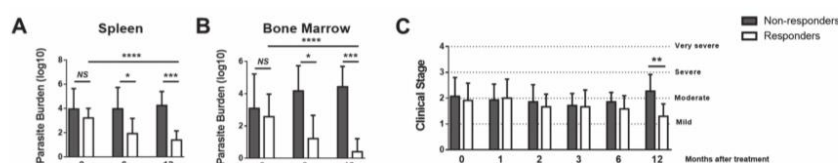
### 2.9. Statistical Analysis

The Kruskal–Wallis test followed by the Dunn test were used for data analysis between two groups. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni's post-hoc test was employed for multiple group comparisons. Exploratory logistic regression models were made in R using the package Bias Reduction in Binomial-Response Generalized Linear Models [31,32]. The Chi-square test was used for statistical analysis to evaluate the significant association between variables. Data are reported as means  $\pm$  standard deviation (SD). Statistically significant values are as follows: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 3. Results

### 3.1. Responder Dogs Exhibit a Decrease in Splenic and Bone Marrow Parasite Loads and Improvement of Clinical Staging

*Leishmania infantum* absolute parasite load evolution in spleen and bone marrow of a cohort of dogs under leishmanicidal treatment for 12 months were distinct between two groups. Dogs that presented a significant reduction in parasite loads from T0 to T12 were grouped as chemotherapy Responders (GR, 46%, 12 dogs), while those that failed to have the parasite burden reduced were grouped as Non-Responders (GNR, 54%, 14 dogs; Figure 1A, B). At T0, before treatment, there were no parasitic loads' differences between groups in both organs (Figure 1A, B), as well as in the clinical staging (Figure 1C). At T6, GR exhibited a noticeable parasitic load reduction in comparison to that of GNR. After one year of treatment (T12), GR's parasitic loads were significantly lower than those at T0 ( $p < 0.001$ ) in both tissues (Figure 1A, B), having decreased 97.3% and 98.5% in bone marrow and spleen, respectively. In opposition, no significant difference was observed for GNR (Figure 1A, B). At T0, both groups presented the same clinical stage—II, characterized by moderate disease. Accompanying the parasite load data, at T12, GR exhibited on average a mild disease (stage I), while GNR remained in stage II (Figure 1C).

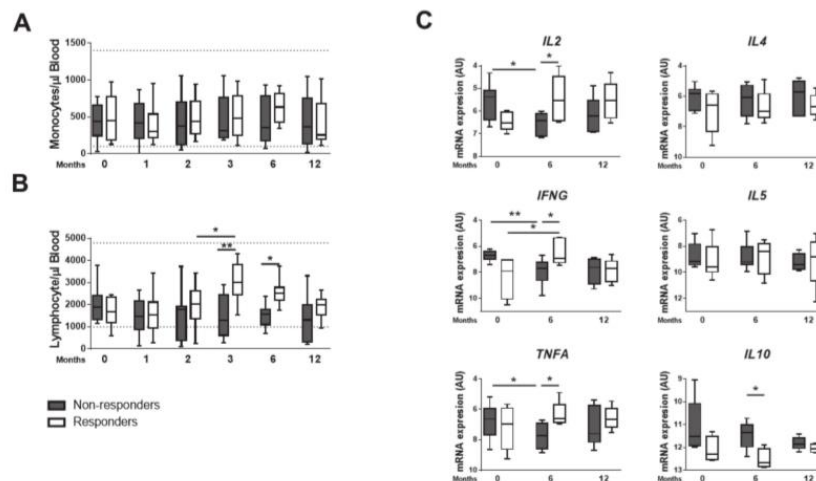


**Figure 1.** Responder dogs exhibited decreased parasite loads and improved the clinical staging. The canine cohort was separated into responder and non-responder dogs regarding the effect of anti-*Leishmania* chemotherapy. The parasite burden was quantified by qPCR in the spleen (A) and bone marrow (B) before and at 6- and 12-months post-treatment. The clinical stage of each dog was recorded at the time of the diagnosis (T0) and upon 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3), 6 (T6) and 12 (T12) months of treatment (C). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD), Responder dogs ( $n = 12$ ) Non responder dogs ( $n = 14$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 3.2. Responder Dogs Display a Th1 Signature

We next addressed the immune response developed by GR and GNR. The median monocytes' counts was similar and within the reference range in both groups (Figure 2A). The lymphocytes' counts, however, changed at T3 and T6 (Figure 2B), not only increasing from T2 to T3 within GR, but also becoming consistently higher than those of GNR at T3 and T6. To further explore, we performed a qPCR analysis on spleen samples at T0, T6 and T12. The GR exhibited a Th1 signature, with increased

levels of *IL2*, *IFNG* and *TNFA* transcripts at T6 (Figure 2C), while no differences were found in *IL17* nor *IL22* (Supplementary Figure S1A). Moreover, a significant reduction on *IL10* transcripts of GR was accompanied by similar levels of Th2-associated *IL4* and *IL5* cytokines (Figure 2C), indicating an effective Th1 response underlying the protective response. Remarkably, these effects on transcripts could be verified in all individual dogs analyzed (Supplementary Figure S1B, C). Overall, our data showed that increased levels of blood lymphocytes and a splenic Th1 response guide the response to therapy.



**Figure 2.** Responder dogs display Th1 signature. The serum absolute numbers of monocytes (A) and lymphocytes (B) was quantified from T0 until 12 months post treatment. mRNA was isolated from spleen biopsies at T0, T6 and T12. Quantitative PCR was performed for *IFNG*, *TNFA*, *IL2*, *IL4*, *IL5* and *IL10* (C). Data are shown as mean  $\pm$  SD or in a box and whisker plot format, Responder dogs ( $n = 9$ ) Non responder dogs ( $n = 8$ ) \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

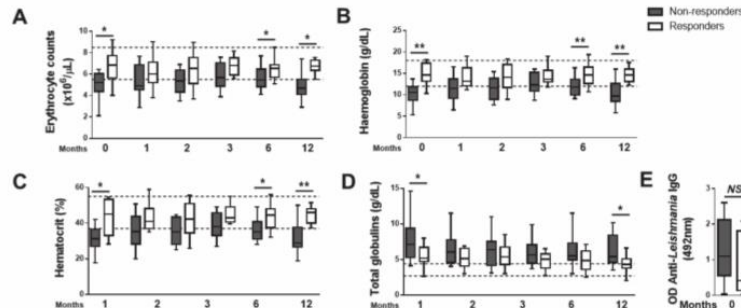
### 3.3. Non-Responder Dogs Failed to Restore the Hematological Parameters to Normal Reference Values

At T0, average GR dogs displayed median erythrocyte counts, hemoglobin and hematocrit levels within the normal reference range, while in GNR dogs, those parameters were sub-optimal (Figure 3A–C). Of note, at T0, 8 out of 14 (57.14%) of GNR had anemia; of these, 4 out of 8 (50%) presented a reticulocyte counting below  $60 \times 10^3/\text{mm}^3$  (had non-regenerative anemia). Regarding the GR dogs, 3 out of 12 (25%) were anemic, with 2 of these presenting a reticulocyte counting superior to  $60 \times 10^3/\text{mm}^3$  (had regenerative anemia). At T12, 9 out of 13 (69.2%) GNR dogs were anemic, compared to none of the GR dogs; among those 9 dogs, only one presented a reticulocyte counting superior to  $60 \times 10^3/\text{mm}^3$ . This is strongly suggestive that non-regenerative anemia indeed progressed in the GNR group of dogs during the one year of follow up, despite treatment. Total globulin levels were increased in both groups, but the GR displayed a significantly lower level (Figure 3D). Interestingly, the difference in globulins was not equivalent to anti-*Leishmania*-specific IgG titers, which could not discriminate GR from GNR (Figure 3E).

The cohort of dogs was monitored during one year through hematological and biochemical analysis performed at one-, two-, three-, six- and twelve-months post-treatment (T1, T2, T3, T6 and T12) (Figure 3A–D). Although a tendency for hematological improvement was observed in all parameters until the third month of treatment, non-responder dogs declined in months 6 and 12 (Figure 3A–D). In opposition, all responder dogs displayed erythrocyte numbers, hemoglobin and hematocrit within the normal reference values upon 12 months of treatment, apart from total globulins, where 3 out of 11 dogs still presented values above the upper limit (Figure 3A–D). Moreover, the observed recovery



of responder dogs was accompanied by a significant reduction in the anti-*Leishmania*-specific IgG (Figure 3E).

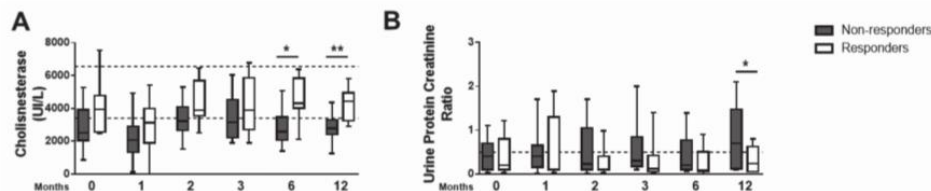


**Figure 3.** Success of anti-*Leishmania* therapy is associated with a restoration of erythrocyte, hemoglobin, hematocrit, as well as total and *Leishmania*-specific globulin values. Erythrocyte number (A) and the values of hemoglobin (B), hematocrit (C), total globulins (D) and anti-*Leishmania* IgG (E) were quantified in the serum at diagnosis (0) and upon 1, 2, 3, 6 and 12 months of anti-*Leishmania* treatment. Data are shown as box and whisker plot format, Responder dogs ( $n = 12$ ), Non responder dogs ( $n = 14$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

Finally, given that our data was suggestive that erythrocyte number, hemoglobin and hematocrit values can be predictive of the therapeutic response in a first moment of evaluation of sick dogs, before treatment, we calculated the relative risk (RR) and the 95% confidence interval (CI) to determine the likelihood of each of these parameters to be associated with the progression of CanL upon treatment. A significant association between decreased hemoglobin (3.14 RR with 1.14–8.7 CI), hematocrit (3.75 RR with 1.05–13.38 CI) and erythrocyte levels (1.82 RR with 0.88–3.73 CI) with the failure of CanL treatment was observed, reinforcing their utility to the prediction of therapeutic response.

#### 3.4. Serum Biochemistry Parameters Are Predictive of Visceral Organ Injury in Non-Responder Dogs

Serum levels of hepatocellular damage markers, alanine and aspartate transaminase (Supplementary Figure S2A, B), and biliary tract disease marker  $\gamma$ -glutamyltransferase (Supplementary Figure S2C), were within the reference range during follow-up in both groups. However, cholinesterase and albumin, proteins synthesized in the liver, were significantly reduced in the GNR at T0, T6 and T12 (Figure 4A and Supplementary Figure S2D). In GNR, while urea and creatinine values were within the reference range (Supplementary Figure S2E, F), the urinary protein/creatinine ratio (UPC), a predictor of renal disease, was elevated (Figure 4B). These peculiar changes are indicative of early hepatic and renal disease in the GNR. The values of hematological, serum biochemistry and parasitic load of the initial and final times of the responder and non-responder dogs to the treatment are shown in Table 1.



**Figure 4.** Non-responder dogs develop sub-clinical hepatic and renal lesions. Serum values of cholinesterase (A) and urine protein/creatinine ratio (B) were quantified at T0, T1, T2, T3, T6 and T12. Data are shown as mean  $\pm$  SD or in a box and whisker plot format, Responder dogs ( $n = 12$ ), Non responder dogs ( $n = 14$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

**Table 1.** Values of hematological, serum biochemistry, oxidative stress parameters and parasitic load of the initial and final times of the responder and non-responder dogs to the treatment

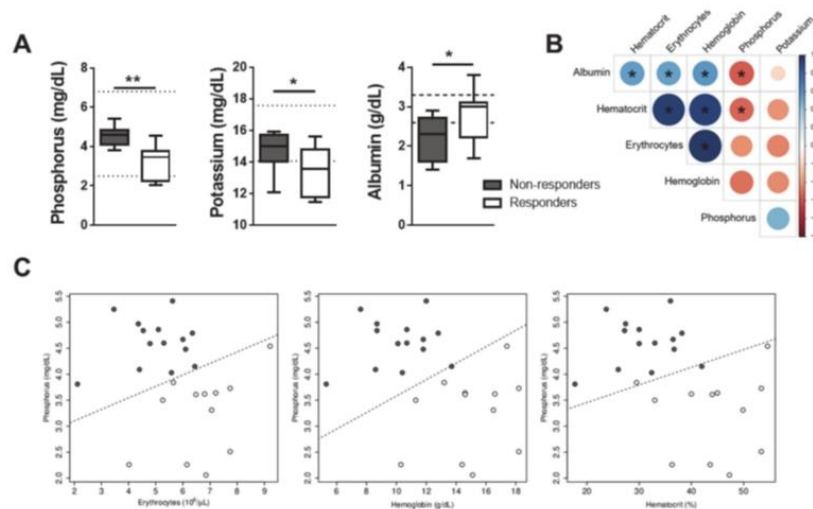
Parameters	Responders (R)		p-Value (T0 vs. T12)	Non Responders (NR)		p-Value (T0 vs. T12)	Normality Value	p-Value (T0 R vs. T0 NR)
	T0	T12		T0	T12			
<b>Hematology</b>								
Erythrocyte ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	6.68	6.73	0.497	5.01	4.97	0.940	5.5–8.5	0.033
Hemoglobin (g/dL)	15.03	14.75	0.271	10.21	10.54	0.885	12–18	0.0002
Hematocrit (%)	41.82	45.12	0.689	31.2	32.78	0.641	37–55	0.0023
Leucocytes ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	9.6	13	0.120	8.9	8.8	0.935	6–17	0.345
Lymphocytes ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	1.69	1.92	0.373	1.92	1.41	0.181	1–4.8	0.406
Monocytes ( $\text{mm}^3$ )	493	424	0.606	457	429	0.972	150–1350	0.276
Reductocytes ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	90	34.6	0.144	51.6	46.1	0.678	<60	0.303
<b>Serum biochemistry</b>								
Total proteins (g/dL)	8.6	7.7	0.102	9	8.6	0.254	5.4–7.1	0.426
Albumin (g/dL)	2.79	3.04	0.167	2.21	2.54	0.260	2.6–3.3	0.017
Globulins (g/dL)	5.7	4.3	0.032	6.7	6.2	0.186	2.7–4.4	0.045
Albumin/Globulin (A/G) ratio	0.5	0.8	0.0682	0.4	0.5	0.242	0.5–1.7	0.081
Calcium (mg/dL)	11.73	10.50	0.330	10.87	10.39	0.218	9–11.3	0.064
GGT (U/L)	5.78	4.54	0.329	4.73	6.11	0.218	1–10	0.736
Creatinine (mg/dL)	1.26	1.0	0.082	1.0	1.2	0.330	0.5–1.4	0.920
Urea (mg/dL)	43.8	37.6	0.579	36.2	22.55	0.060	21–60	0.591
Cholesterol (mg/dL)	22.9	33.5	<0.0001	20.71	28.8	0.001	31–71	0.112
Magnesium (mg/dL)	1.62	2.22	0.264	1.66	1.86	0.017	1.8–2.4	0.104
HDL (mg/dL)	57.6	145.2	<0.0001	45.5	112.9	<0.0001	33–120	0.062
Triglycerides (mg/dL)	75.72	73.42	0.853	72.7	100	0.029	20–112	0.333
ALT (U/L)	51.2	66.9	0.830	42.4	66.8	0.117	21–102	0.214
FA (U/L)	74.97	86.82	0.587	101	124.7	0.933	20–156	0.255
AST (U/L)	23.96	32.82	0.087	40.93	32.82	0.615	23–66	0.368
Glucose (mg/dL)	93.7	90	0.472	90.8	87.5	0.617	65–118	0.497
Iron ( $\mu\text{g/dL}$ )	280.07	85.29	0.094	360.4	142.2	0.075	30–180	0.149
Phosphorus (mg/dL)	3.24	3.24	0.401	4.61	3.074	0.011	2.5–6.0	0.0085
Potassium (mmol/L)	13.40	13.38	0.980	14.95	14.42	0.229	12.3–15.7**	0.0023
CK (U/L)	47.08	152.39	<0.0001	37.35	87.79	0.106	100–200**	0.504
CK-MB (U/L)	145.71	24.84	0.310	82.07	38.07	0.121	31–38.8	0.432
Cholinesterase (U/L)	4022.2	4200.5	0.737	3.198	2.807	0.911	1210–3020	0.057
UPC	0.48	0.31	0.113	0.44	0.85	0.342	0.5*	0.833
<b>Serologic</b>								
ELISA (OD)—Anti-Leishmania IgG	0.42	0.13	0.032	1.27	0.81	0.155	0.17**	0.324
<b>Parasite Load</b>								
Spleen (Parasite Burden (log10))	3.225	1.298	<0.0001	3.761	4.252	0.969		0.382
Bone marrow (Parasite Burden (log10))	2.580	0.408	<0.0001	2.879	2.579	0.431		0.748

Hematology and serum biochemistry normality value (NV). Source: Kariako et al. [33]. NV—# UPC < 0.5 healthy animals; 0.5–1.0 borderline; >1.0 glomerular proteinuria. Source: Solano-Callejo et al. [5]. T0: time 0 (before treatment); T12: time 12 (12 months of treatment). \*\* NV based on the negative control values of the study. All significant values are shown in bold.

### 3.5. Development of a Mathematical Model with Predictive Value for the Success of CanL Chemotherapy

Apart from erythrocytes, hemoglobin and hematocrit (Figure 3A–C), phosphorous, and to a lesser extent, potassium and albumin also significantly discriminated GR from GNR at T0 (Figure 5A). High Spearman correlation coefficients were found between erythrocytes, hematocrit and hemoglobin (Figure 5B). Logistic regression models with the lowest Akaike information criterion (AIC) and higher accuracy using a leave-one-out cross-validation were selected for phosphorus plus one of the three highly correlated variables erythrocytes, hematocrit or hemoglobin (Figure 5C). The highest accuracy was obtained considering phosphorus and erythrocytes. For this case, the log(odds) of a successful treatment, using the full dataset, can be given by:

$$\log(\text{odds}) = 14.067 - 5.289 \times [\text{Phosphorus}] + 1.170 \times \text{Number of erythrocytes} \quad (1)$$



**Figure 5.** Development of a mathematical model with predictive value for the success of CanL chemotherapy including the measurement of the erythrocyte and phosphorus parameters. (A) The serum values of phosphorous, potassium and albumin were quantified at T0. (B) The Spearman linear correlation coefficient is shown for serum albumin, hematocrit, erythrocytes, hemoglobin, phosphorous and potassium values. (C) Scatterplots between phosphorous and hematocrit or erythrocytes or hemoglobin serum values. Data are shown as mean  $\pm$  SD or in a box and whisker plot format. Responder dogs ( $n = 12$ ), Non responder dogs ( $n = 14$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

The probability is obtained by applying the logistic function:  $(\exp(x))/(1 + \exp(x))$ , where  $x$  is the log(odds). Remarkably, this formula allowed 100% discrimination between GR and GNR, demonstrating the high predictive power of our mathematical model.

## 4. Discussion

Until recently, most studies of prognostic factors for treatment success or failure in leishmaniasis were restricted to humans [33–37], and the infected dog has been seen only as a protozoan reservoir. This is an innovative longitudinal study of prognostic factors in *L. infantum* naturally infected dogs under treatment that resulted in a clear distinction of two profiles of CanL dogs that responded differently to the same antiparasitic therapy, based on their tissue parasite load reduction. Dogs with reduced parasite numbers are less likely to develop clinical signs and are less infectious to vectors [5].

Studies indicate that the successful resolution of *Leishmania* infections depend on a response characterized by IFN- $\gamma$ , IL-2 and TNF- $\alpha$  predominance, which increase phagocytic efficiency and

lymphocyte cytotoxicity, triggering a protective immune response [38,39]. Accordingly, we observed that responder dogs exhibited a consistent Th1 signature that accompanied parasitism reduction upon treatment, in opposition to the non-responder group.

In the present study, the standard parameters for clinical staging of CanL [8] and follow-up of the dogs, such as albumin/globulin ratio, non-regenerative anemia or renal functions, were assessed individually from the beginning to the end of the study. However, only at the end of the one-year study did the treatment outcome allow the determination of which dogs could be classified as responders or non-responders. The evident dichotomy between GR and GNR dogs allowed for identifying two laboratory parameters predictive of therapeutic success: erythrocyte counts and serum phosphorus dosage. Anemia is commonly observed in human and canine leishmaniasis and can originate from reduced production and/or increased destruction of erythrocytes [27,40,41]. During chronic inflammatory diseases, anemia results from low iron circulating levels, while inflammatory cytokines such as  $\text{TFN-}\alpha$ , IL-1 and  $\text{IFN-}\gamma$  inhibit erythropoiesis, and erythrocyte membrane damage by oxidizing agents shortens the lifespan of erythrocytes [42]. In chronic infections such as CanL, these damaged erythrocytes are retained and destroyed in the spleen, which becomes enlarged as a clinical sign of the disease. This is accompanied by a dysregulation of iron transporting proteins leading to the accumulation of storage iron [43,44]. This explains the normocytic normochromic type of anemia most dogs had in the beginning of the present study, which also demonstrates the improper iron supplementation during the treatment, as already described in the literature [45–47]. In chronic renal disease, which is common in CanL, anemia also results from decreased erythropoietin production in the kidney [8,48]. Kidneys are the main route for phosphorus excretion and hyperphosphatemia promotes progressive renal lesions [49], as described in dogs with late-stage CanL [50]. Serum globulin and acute phase proteins levels, proteinuria and UPC ratio are considered biomarkers for the clinical monitoring of dogs during leishmanicidal treatment and post-treatment [3,17,18,51,52]. However, very few studies have approached the identification of factors, to be used as reliable prognosis predictors, based on the outcome (death or cure) upon therapy [53]. In the present study, moderate-stage CanL dogs exhibited overall serum phosphorus—a marker of renal failure—within the reference range, but the logistic regression models clearly indicated that phosphorus' in addition to erythrocyte's changes were sensitive enough to predict chemotherapy success or failure.

Phosphorus interplays with calcium via modulation of several hormones and their serum concentration is approximately inversely related [50]. Overall, non-responder dogs of our study displayed lower magnesium, higher phosphorus and lower Ca/P ratio compared to responder dogs, with renal consequences demonstrated by elevated UPC ratio. Renal impairment-related ion imbalances underlie several clinical manifestations; for instance, magnesium is an enzymatic cofactor that participates in diverse metabolic reactions [40,54], including those related to erythropoiesis [55,56].

Cholinesterase and albumin serum levels normalized in responder dogs after six months of therapy, unlike in non-responders. As the liver is a site of *L. infantum* activity [57], this discrete interference with hepatic synthetic function could explain our findings in non-responder dogs. Here, serum urea and creatinine were within the reference values in both group of dogs. This corroborates literature data showing that azotemia is an uncommon finding, despite elevated frequencies of renal pathologies in CanL [58]. Creatinine is a by-product of CK, whose levels are reduced in dogs with LCan [59]; therefore, we suggest that this bias of azotemia diagnosis in advanced CanL results from sub-concentration of creatinine and might lead to kidney disease underdiagnoses. It has been stressed in the literature that the active infection by *L. infantum* and CanL progression relates with immune complex-mediated disease [60], which plays an important role in the pathophysiology of diverse clinical manifestations, including immune-mediated hemolytic anemia, glomerular lesions and renal failure [38,61]. In this sense, prednisolone was chosen as an anti-inflammatory drug in the present study during the short-term in all dogs to minimize the formation and circulation of soluble immune complexes and reduce inflammation through an inhibitory effect on complement activation [62,63]. Glucocorticoid therapy benefits in the treatment of CanL have been described

previously [20,25,26]. It is worth mentioning that several studies have shown that the short- or long-term oral glucocorticoid administration in dogs do not induce significant changes in the several hematological and biochemical parameters [64–67]. The four-week course of prednisolone did not seem to have interfered with the biomarkers evaluated herein, as evaluations at T1 did not behave differently than those seen at subsequent follow-up points, as demonstrated in Figures 2–4. Upon corticotherapy at anti-inflammatory doses, a discrete elevation in liver enzymes is expected in dogs, as previously described [66,68].

Altogether, we developed a mathematical formula using erythrocytes and phosphorus as markers for a prognosis of antiparasitic therapy success in CanL at the time of first diagnosis. Nevertheless, the study displays the reduced cohort studied, and the use of second line anti-parasite drugs, given the constraints for therapeutic approaches to CanL in Brazil, as major limitations. Because this was a long-term clinical study, it resulted in a small number of dogs that were followed up until the last evaluation. Nevertheless, the gathered data was so consistent that it allowed the creation of the formula, which can be an initial guide for further studies with larger sample sizes and different methods of cross-validation and in cohorts treated with first-line drugs. Taken together, these results are highly encouraging and may represent a new paradigm for clinical assistance, allowing a precocious therapeutic interference based on an improved diagnosis.

**Supplementary Materials:** Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/5/745/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.A.P., R.S. and S.M.B-M.; methodology, F.A.P., R.S. and S.M.B-M.; formal analysis, R.S.G., F.A.P., R.J.D-O., R.A., J.G., E.M.R-S., D.F.L., H.G., R.S. and S.M.B-M.; investigation, R.S.G., F.A.P., R.J.D-O., R.A., J.G., D.F.L., E.M.R-S., H.G., R.S. and S.M.B-M.; resources, R.J.D-O., H.G., R.S. and S.M.B-M.; data curation, R.S.G., F.A.P., R.A., J.G., E.M.R-S., H.G. and S.M.B-M.; writing—original draft preparation, R.S.G., F.A.P., R.S. and S.M.B-M.; writing—review and editing, R.S. and S.M.B-M.; supervision, R.S. and S.M.B-M.; project administration, R.S. and S.M.B-M.; funding acquisition, R.J.D-O., R.S. and S.M.B-M.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by the Brazilian agencies Bahia Research Foundation—FAPESB (Grant n° PRONEM 498/2011-PNE 0002/2011 to S.M.B-M), National Council for Scientific and Technological Development—CNPq (PQ scholarship n° 307813/2018-5 to SMBM, and n° 303621/2015-0 to HG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES (PDSE scholarship n° 88881.189587/2018-01 to R.S.G; Finance Code 001 and PV scholarship n° 23066.033859/2018-73 to R.S.). This work was supported by grants from CESPÚ (TramTap-CESPÚ-2016, Chronic-TramTap\_CESPÚ\_2017 and TraTapMDMA-CESPÚ-2018), from the Northern Portugal Regional Operational Programme (NORTE 2020), under the Portugal 2020 Partnership Agreement, through the European Regional Development Fund (FEDER) (NORTE-01-0145-FEDER-000013), funded by FEDER funds through COMPETE2020—Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) and the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (contract IF/00021/2014 to R.S.), Infect-Era (project INLEISH to R.S.) and Proyecto SNIP N° 292900 “Creación del Servicio de Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de Animales Domésticos de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología-IGBI. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## Abbreviations

AIC	Akaike information criterion
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate transaminase
Ca	Calcium
CanL	Canine leishmaniasis
CI	Confidence interval
CK	Creatine kinase
CK-MB	Creatine kinase MB
DOAJ	Directory of open access journals
GGT	Gamma-glutamyl transferase

GNR	Group of non-responder dogs
GR	Group of responder dogs
IFNG/IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL1	Interleukin-1
IL2	Interleukin-2
IL4	Interleukin-4
IL5	Interleukin-5
IL10	Interleukin-10
IL17	Interleukin-17
IL22	Interleukin-22
LD	Linear dichroism
MDPI	Multidisciplinary Digital Publishing Institute
P	Phosphorus
q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
RR	Relative risk
Th1	T helper 1 cell
Th2	T helper 2 cell
TLA	Three letter acronym
TNFA/TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
UPC	Urinary protein/creatinine ratio

## References

- Sevá, A.P.; Ovallos, F.G.; Amaku, M.; Carrillo, E.; Moreno, J.; Galati, E.A.B.; Lopes, E.G.; Soares, R.M.; Ferreira, F. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0160058.
- Lippi, I.; Guidi, G.; Marchetti, V.; Tognetti, R.; Meucci, V. Prognostic role of the product of serum calcium and phosphorus concentrations in dogs with chronic kidney disease: 31 cases (2008–2010). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2014**, *245*, 1135–1140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Paltrinieri, S.; Gradoni, L.; Roura, X.; Zatelli, A.; Zini, E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet. Clin. Pathol.* **2016**, *45*, 552–578. [[CrossRef](#)]
- WHO. Leishmaniasis. Available online: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (accessed on 20 November 2019).
- Magalhães-Junior, J.T.; Feitosa, T.; Porfirio-Passos, G.; Farias, D.; Roberto, C.; Barrouin-Melo, S.M. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis : Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. *Vet. Parasitol.* **2016**, *223*, 120–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Borja, L.S.; Sousa, O.M.F.; Solcà, M.D.S.; Bastos, L.A.; Bordoni, M.; Magalhães, J.T.; Larangeira, D.F.; Barrouin-Melo, S.M.; Fraga, D.B.M.; Veras, P.S.T. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet. Parasitol.* **2016**, *132*, 83–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Torreilha, R.B.P.; Utsunomiya, Y.T.; Bosco, A.M.; Almeida, B.F.; Pereira, P.P.; Narciso, L.G.; Pereira, D.C.M.; Baptistioli, L.; Calvo-bado, L.; Courtenay, O. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev. Vet. Med.* **2016**, *132*, 83–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Solano-Gallego, L.; Miró, G.; Koutinas, A.; Cardoso, L.; Pennisi, M.G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. The LeishVet Group LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites Vectors* **2011**, *4*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Oliva, G.; Roura, X.; Crotti, A.; Maroli, M.; Castagnaro, M.; Gradoni, L.; Lubas, G.; Paltrinieri, S.; Zatelli, A.; Zini, E. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2010**, *236*, 1192–1198. [[CrossRef](#)]
- Manna, L.; Corso, R.; Galiero, G.; Cerrone, A.; Muzj, P.; Gravino, A.E. Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 289. [[CrossRef](#)]

11. Marcondes, M.; Day, M.J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Res. Vet. Sci.* **2019**, *123*, 261–272. [[CrossRef](#)]
12. Nogueira, S.; Avino, V.C.; Galvis-Ovallos, F.; Pereira-Chioccola, V.L.; Antonio, M.; Moreira, B.; Paula, A.; Lopes, P.; Molla, L.M.; Menz, I. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Da Silva, S.; Amorim, I.F.G.; Ribeiro, R.R.; Azevedo, E.G.; Demicheli, C.; Melo, M.N.; Tafuri, W.L.; Gontijo, N.F.; Michalick, M.S.M.; Frézard, F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2858–2867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nery, G.; Becerra, D.R.D.; Borja, L.S.; Magalhães-Junior, J.T.; Souza, B.M.P.S.; Franke, C.R.; Veras, P.S.T.; Larangeira, D.F.; Barrouin-Melo, S.M. Evaluation of parasite infectivity for *Lutzomyia longipalpis* by xenodiagnosis in dogs treated for natural visceral leishmaniasis. *Braz. J. Vet. Res.* **2017**, *37*, 701–707.
15. Ponte-Sucre, A.; Gamarro, F.; Dujardin, J.; Barrett, M.P.; Garcı, R.; Pountain, A.W.; Mwenechanya, R.; Papadopoulou, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0006052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Baxarias, M.; Álvarez-Fernández, A.; Martínez-Orellana, P.; Montserrat-Sangrà, S.; Ordeix, L.; Rojas, A.; Nachum-Biala, Y.; Baneth, G.; Solano-Gallego, L. Does co-infection with vector-borne pathogens play a role in clinical canine leishmaniasis? *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Roura, X.; Fondati, A.; Lubas, G.; Gradoni, L.; Maroli, M.; Oliva, G.; Paltrinieri, S.; Zatelli, A.; Zini, E. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *Vet. J.* **2013**, *198*, 43–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Maia, C.; Campino, L. Biomarkers Associated with *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sellon, R.K.; Menard, M.M.; Meuten, D.J.; Lengerich, E.J.; Steurer, F.J.; Breitschwerdt, E.B. Endemic Visceral Leishmaniasis in a Dog from Texas. *J. Vet. Intern. Med.* **1993**, *7*, 16–19. [[CrossRef](#)]
20. Ciaramella, P. Canine Leishmaniasis: Therapeutic Aspects \*. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* **2003**, *25*, 370–375.
21. Noli, C.; Auxilia, S.T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis. *Vet. Dermatol.* **2005**, *16*, 213–232.
22. Pennisi, M.G.; De Majo, M.; Masucci, M.; Britti, D.; Vitale, F.; Del Maso, R. Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniasis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Vet. Rec.* **2005**, *156*, 346–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Barrouin-Melo, S.M.; Larangeira, D.F.; de Andrade Filho, F.A.; Trigo, J.; Julião, F.S.; Franke, C.R.; Palis Aguiar, P.H.; Conrado dos-Santos, W.L.; Pontes-de-Carvalho, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet. J.* **2006**, *171*, 331–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Paparcone, R.; Fiorentino, E.; Cappiello, S.; Gizzarelli, M.; Gradoni, L.; Oliva, G.; Manzillo, V.F. Sternal aspiration of bone marrow in dogs: A practical approach for canine leishmaniasis diagnosis and monitoring. *J. Vet. Med.* **2013**, *2013*, 217314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Adamama-Moraitou, K.K.; Saridomichelakis, M.N.; Polizopoulou, Z.; Kritsepi, M.; Tsompanakou, A.; Koutinas, A.F. Short-term exogenous glucocorticosteroidal effect on iron and copper status in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Can. J. Vet. Res.* **2005**, *69*, 287–292.
26. Cortese, L.; Pelagalli, A.; Piantedosi, D.; Mastellone, V.; Di Loria, A.; Lombardi, P.; Ciaramella, P.; Avallone, L. The effects of prednisone on haemostasis in leishmaniotic dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J.* **2008**, *177*, 405–410. [[CrossRef](#)]
27. Harvey, J.W.; Stevens, A.; Lowe, J.S.; Scott, I. *Veterinary Hematology*; Elsevier: St. Louis, MO, USA, 2012; ISBN 9781437701739.
28. Costa, I.; Carvalho, F.; Magalhães, T.; Guedes De Pinho, P.; Silvestre, R.; Dinis-Oliveira, R.J. Promising blood-derived biomarkers for estimation of the postmortem interval. *Toxicol. Res. (Camb)* **2015**, *4*, 1443–1452. [[CrossRef](#)]
29. Silvestre, R.; Santarém, N.; Cunha, J.; Cardoso, L.; Nieto, J.; Carrillo, E.; Moreno, J.; Cordeiro-da-Silva, A. Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. *Vet. Parasitol.* **2008**, *158*, 23–30. [[CrossRef](#)]

30. Rolão, N.; Cortes, S.; Rodrigues, O.R.; Campino, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by Real-Time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction—Enzyme-linked immunosorbent assay real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction—Enzyme-linked i. *J. Parasitol.* **2004**, *90*, 1150–1154. [[CrossRef](#)]
31. R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria. Available online: <https://www.r-project.org/> (accessed on 20 November 2019).
32. Kosmidis I Bias Reduction in Binary-Response Generalized Linear Models. R Package Version 0.6.2. Available online: <https://cran.r-project.org/package=brglm%3E> (accessed on 20 November 2019).
33. Tourinho, B.D.; Amâncio, F.F.; Ferraz, M.L.; Carneiro, M. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in patients treated with liposomal amphotericin B in an endemic state in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *111*, 163–171. [[CrossRef](#)]
34. Da Silva, T.A.M.; Morais, M.H.F.; Lopes, H.M.O.R.; Gonçalves, S.A.; Magalhães, F.D.C.; Amâncio, F.F.; Antunes, C.M.F.; Carneiro, M. Prognostic factors associated with death from visceral leishmaniasis: A case-control study in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2020**, *7*, 346–354. [[CrossRef](#)]
35. Belo, V.S.; Struchiner, C.J.; Barbosa, D.S.; Nascimento, B.W.L.; Horta, M.A.P.; da Silva, E.S.; Werneck, G.L. Risk Factors for Adverse Prognosis and Death in American Visceral Leishmaniasis: A Meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Coura-Vital, W.; de Araújo, V.E.M.; Reis, I.A.; Amancio, F.F.; Reis, A.B.; Carneiro, M. Prognostic Factors and Scoring System for Death from Visceral Leishmaniasis: An Historical Cohort Study in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Costa, D.L.; Rocha, R.L.; de Brito Ferreira Chaves, E.; de Vasconcelos Batista, V.G.; Costa, H.L.; Nery Costa, C.H. Predicting death from kala-azar: Construction, development, and validation of a score set and accompanying software. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2016**, *49*, 728–740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Carrillo, E.; Moreno, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2009**, *128*, 67–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Moreno, J.; Alvar, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* **2002**, *18*, 399–405. [[CrossRef](#)]
40. Varma, N.; Naseem, S. Hematologic changes in visceral Leishmaniasis/Kala Azar. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* **2010**, *26*, 78–82. [[CrossRef](#)]
41. De Pinho, F.A.; Vendrame, C.M.V.; Maciel, B.L.L.; Dos Santos Silva, L.; Miyashiro, S.I.; Jerônimo, S.M.B.; Goto, H. Association between insulin-like growth factor-i levels and the disease progression and anemia in visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *4*, 808–815. [[CrossRef](#)]
42. Madu, A.J.; Ughasoro, M.D. Anaemia of Chronic Disease: An In-Depth Review. *Med. Princ. Pract.* **2017**, *26*, 1–9. [[CrossRef](#)]
43. Zaidi, A.; Singh, K.P.; Ali, V. *Leishmania* and its quest for iron: An update and overview. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2017**, *211*, 15–25. [[CrossRef](#)]
44. Laranjeira-Silva, M.F.; Hamza, I.; Pérez-Victoria, J.M. Iron and Heme Metabolism at the *Leishmania*–Host Interface. *Trends Parasitol.* **2020**, *36*, 279–289. [[CrossRef](#)]
45. Poggiali, E.; Migone De Amicis, M.; Motta, I. Anemia of chronic disease: A unique defect of iron recycling for many different chronic diseases. *Eur. J. Intern. Med.* **2014**, *25*, 12–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Clark, M.A.; Goheen, M.M.; Fulford, A.; Prentice, A.M.; Elnagheeb, M.A.; Patel, J.; Fisher, N.; Taylor, S.M.; Kasthuri, R.S.; Cerami, C. Host iron status and iron supplementation mediate susceptibility to erythrocytic stage *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Pieracci, F.M.; Barie, P.S. Iron and the risk of infection. *Surg. Infect. (Larchmt)* **2005**, *6*, 41–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Chen, T.K.; Knicely, D.H.; Grams, M.E. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *J. Am. Med. Assoc.* **2019**, *13*, 1294–1304. [[CrossRef](#)]
49. Martorelli, C.R.; Kogika, M.M.; Chacar, F.C.; Caragelasco, D.S.; de Campos Fonseca Pinto, A.C.B.; Lorigados, C.A.B.; Andrade, L.C. Urinary fractional excretion of phosphorus in dogs with spontaneous chronic kidney disease. *Vet. Sci.* **2017**, *4*, 67. [[CrossRef](#)]
50. Cortadellas, O.; Fernández-del Palacio, M.J.; Talavera, J.; Bayón, A. Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniosis at different stages of chronic kidney disease. *Vet. Rec.* **2009**, *164*, 487–490. [[CrossRef](#)]

51. Rougier, S.; Hasseine, L.; Delaunay, P.; Michel, G.; Marty, P. One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* **2012**, *186*, 245–253. [[CrossRef](#)]
52. Solano-Gallego, L.; Di Filippo, L.; Ordeix, L.; Planellas, M.; Roura, X.; Altet, L.; Martínez-orellana, P. Early reduction of *Leishmania infantum*—Specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 235. [[CrossRef](#)]
53. Zanette, M.F.; de Lima, V.M.F.; Laurenti, M.D.; Rossi, C.N.; Vides, J.P.; da Costa Vieira, R.F.; Biondo, A.W.; Marcondes, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2014**, *47*, 105–107. [[CrossRef](#)]
54. Kaneko, J.; Harvey, J.; Bruss, M. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2008; ISBN 9780123704917.
55. Elin, R.J.; Utter, A.; Tan, H.K.; Corash, L. Effect of magnesium deficiency on erythrocyte aging in rats. *Am. J. Pathol.* **1980**, *100*, 765–778.
56. Nicolato, R.D.C.; De Abreu, R.T.; Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.D.O.; Reis, L.E.S.; Carvalho, M.D.G.; Carneiro, C.M.; Giunchetti, R.C.; Bouillet, L.E.M.; Lemos, D.S.; et al. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Tonin, A.A.; Calado, A.M.C.; Bottari, N.B.; Dalenogare, D.; Thomé, G.R.; Duarte, T.; Duarte, M.M.M.F.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R.C.; Alves, L.C.; et al. Novel markers of inflammatory response and hepatic dysfunction in canine leishmaniasis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *44*, 61–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Meléndez-Lazo, A.; Ordeix, L.; Planellas, M.; Pastor, J.; Solano-Gallego, L. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Res. Vet. Sci.* **2018**, *117*, 18–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Paltrinieri, S.; Pintore, L.; Balducci, F.; Giordano, A.; Costabile, A.; Bernardini, M. Serum creatine kinase isoenzymes and macroenzymes in dogs with different neurologic diseases. *Vet. Clin. Pathol.* **2017**, *46*, 91–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Hosein, S.; Blake, D.P.; Solano-Gallego, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology* **2016**, *144*, 95–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Solano-Gallego, L.; Koutinas, A.; Miró, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M.G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* **2009**, *165*, 1–18. [[CrossRef](#)]
62. Whitley, N.T.; Day, M.J. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. *J. Small Anim. Pract.* **2011**, *52*, 70–85. [[CrossRef](#)]
63. Miller, E. Immunosuppressive Therapy in the Treatment of Immune-mediated Disease. *J. Vet. Intern. Med.* **1992**, *6*, 206–213. [[CrossRef](#)]
64. Moore, G.E.; Mahaffey, E.A.; Hoenig, M. Hematologic and serum biochemical effects of long-term administration of anti-inflammatory doses of prednisone in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **1992**, *53*, 1033–1037.
65. Muñoz, J.; Soblechero, P.; Duque, F.J.; Macías-García, B.; Ruiz, P.; Zaragoza, C.; Barrera, R. Effects of Oral Prednisone Administration on Serum Cystatin C in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2017**, *31*, 1765–1770. [[CrossRef](#)]
66. Masters, A.K.; Berger, D.J.; Ware, W.A.; Langenfeld, N.R.; Coetzee, J.P.M.; Ward, J.L. Effects of short-term anti-inflammatory glucocorticoid treatment on clinicopathologic, echocardiographic, and hemodynamic variables in systemically healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* **2017**, *79*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Tinklenberg, R.L.; Murphy, S.D.; Mochel, J.P.; Seo, Y.-J.; Mahaffey, A.L.; Yan, Y.; Ward, J.L. Evaluation of dose-response effects of short-term oral prednisone administration on clinicopathologic and hemodynamic variables in healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* **2020**, *81*, 317–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Whittmore, J.C.; Mooney, A.P.; Price, J.M.; Thomason, J. Clinical, clinicopathologic, and gastrointestinal changes from aspirin, prednisone, or combination treatment in healthy research dogs: A double-blind randomized trial. *J. Vet. Intern. Med.* **2019**, *33*, 1977–1987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



**Capítulo II** - Publicado na Revista Veterinary Parasitology. Fator de impacto: 2.6.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109526>.

## **Adjuvantes nutricionais com propriedades antioxidantes no tratamento da leishmaniose canina**

Rafaela de Sousa Gonçalves et al.

### **Resumo**

A melhora clínica de cães tratados para a leishmaniose canina (LCan) requer redução das cargas de *Leishmania infantum* por meio de compostos oxidantes intracelulares no intuito de destruir o parasito. No entanto, o excesso de espécies oxidativas e o consumo de antioxidantes podem culminar em estresse oxidativo, resultando em inflamação aumentada e generalizada. Nosso objetivo foi avaliar se a adição precoce ou tardia de adjuvantes nutricionais (NAs) – ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e vitaminas B – a medicamentos anti-*Leishmania* (ALDs) no tratamento da LCan seria clinicamente benéfica. Para isso, biomarcadores séricos incluindo parâmetros de estresse oxidativo foram analisados durante 12 meses em cães alocados em dois grupos de tratamento: (G1) NAs administrados 30 dias antes do início das ALDs; e (G2) NAs administradas a partir de 61 dias após o início das ALDs. Tanto G1 quanto G2 continuaram recebendo NAs até o 12º mês. As ALDs administradas foram metronidazol associado ao cetoconazol (40 dias), seguido de alopurinol do 41º dia até o 12º mês. O G1 apresentou controle inflamatório superior, com redução de globulinas ( $p = 0,025$ ), imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania* ( $p=0,016$ ), proteína total ( $p = 0,031$ ) e relação albumina sérica/globulina aumentada ( $p = 0,033$ ), em comparação ao G2. O uso precoce de NAs associados a ALDs é clinicamente benéfico no tratamento de cães com LCan.

**Palavras-chave:** Complexo B, *Leishmania infantum*, Nutracêuticos, Ômega 3, Vitaminas.

### **Introdução**

Cães domésticos são suscetíveis à infecção por *Leishmania infantum*, um protozoário intracelular causador da leishmaniose canina (LCan), uma doença infecciosa zoonótica crônica grave que requer tratamento e monitoramento (Solano-Gallego et al., 2011). *L. infantum* modula o sistema imunológico canino, favorecendo uma resposta imune predominantemente orquestrada por linfócitos TH2 (Pinelli et al., 1994). Esta resposta é caracterizada pela produção

excessiva de anticorpos não protetores que causam doença sistêmica imunomediada devido à deposição de imunocomplexos nos órgãos do hospedeiro (Manna et al., 2006; Baneth et al., 2008). Além disso, altas cargas parasitárias se desenvolvem nos cães mais suscetíveis, produzindo lesões teciduais diretas, que se associam à doença imunomediada e culminam na manifestação de vários sinais clínicos e alterações clínico-patológicas inflamatórias (da Costa-Val et al., 2007; Alves et al., 2009; Torrecilha et al., 2016).

A *Leishmania* pode evadir do sistema imunológico inibindo a explosão oxidativa e neutralizando espécies oxidativas, como superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila ( $OH^-$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) ou óxido nítrico (NO) produzido dentro dos fagolisossomos dos macrófagos, onde esses protozoários conseguem sobreviver e se multiplicar (Laskay et al., 2003; Van Assche et al., 2011; Angiulli et al., 2015). As espécies reativas de oxigênio são moléculas instáveis também produzidas durante os processos metabólicos do hospedeiro e requerem uma produção proporcional de moléculas antioxidantes para prevenir danos aos tecidos (Pizzino et al., 2017). A produção de espécies oxidativas aumenta durante doenças infecciosas ou inflamatórias (Dimri et al., 2008). Durante a inflamação crônica, existe um desequilíbrio redox caracterizado pelo estresse oxidativo, que resulta da liberação de um excesso de oxidantes e do consumo de moléculas antioxidantes que os neutralizam (Paltrinieri, 2013). Evidências de estresse oxidativo foram demonstradas na LCan, com presença marcante de espécies oxidativas no hospedeiro (Bildik et al., 2004; Paltrinieri et al., 2010; Heidarpour et al., 2012; Almeida et al., 2013; Souza e outros, 2014).

O antimoniato de meglumina é considerado o medicamento de primeira escolha no tratamento da LCan na Europa, frequentemente concomitante ao alopurinol (SolanoGallego et al., 2011). No entanto, as recaídas ocorrem numa proporção considerável nos cães tratados, particularmente nos mais suscetíveis (Ike-da-Garcia et al., 2007; Manna et al., 2015). No Brasil, os antimoniais são utilizados no tratamento da leishmaniose visceral humana, sendo proibido seu uso em animais com a justificativa de evitar uma possível seleção de parasitos resistentes (Brasil, 2018). Assim, a prospecção de medicamentos e protocolos alternativos se faz necessária para o tratamento da LCan.

Vários estudos demonstraram a importância da imunonutrição no tratamento de doenças inflamatórias humanas com diversos objetivos, incluindo a redução e prevenção de danos teciduais causados pelo estresse oxidativo (Simopoulos, 1991; Zandi et al., 2004; Barrouin-Melo et al., 2004; Barrouin-Melo et al., 2004; Barrouin-Melo et al., 2018). Dado o impacto metabólico dos fatores inflamatórios e parasitários na LCan, o potencial terapêutico de

moléculas nutracêuticas, como as do óleo de peixe, do óleo de krill e dos cogumelos secos, foi avaliado (Cortese et al., 2015; Lombardi et al., 2019; Mastellone et al., 2020). Entre os adjuvantes nutricionais comumente usados com propriedades antioxidantes, os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFA), definidos como ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFA), isolados principalmente de peixes de água fria, são amplamente citados na literatura devido à sua propriedade antiinflamatória e antioxidante (DeFi-lippis e Sperling, 2006; Backes et al., 2016; Braz-De-Melo et al., 2019). Os efeitos terapêuticos do ômega-3 foram demonstrados em estudos de doenças humanas e animais (Brown et al., 1998; Thomas et al., 2015; Backes et al., 2016; Barrouin-Melo et al., 2016; Rahimi-Niyyat et al., 2016; Rahimi-Niyyat et al., 2016; Rahimi-Niyyat et al., 2016; al., 2018; Freitas e Campos, 2019). As vitaminas do complexo B compõem um grupo de oito vitaminas hidrossolúveis que atuam como coenzimas em reações enzimáticas e demonstraram ajudar a melhorar diversas patologias (Butler et al., 2006; Barrouin-Melo et al., 2018).

A melhora clínica de cães em tratamento para LCan requer redução da carga parasitária, que depende da ação de compostos oxidantes intracelulares para destruir parasitos, mas também expõe o hospedeiro ao estresse oxidativo sistêmico. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar se a adição de adjuvantes nutricionais (PUFA ômega-3 e vitaminas B), administrados precoce ou tardiamente aos medicamentos anti-*Leishmania* de segunda escolha (metronidazol, cetoconazol e alopurinol) no tratamento da LCan ajudaria a promover a melhora clínica dos cães, conforme expresso em um painel de biomarcadores séricos, incluindo parâmetros de estresse oxidativo e resultados clínicos.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Ética, animais e desenho experimental**

O estudo foi realizado no Hospital Universitário de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil, e os animais eram cães domiciliados (Gonçalves et al., 2020). Este estudo consistiu no acompanhamento clínico de um subconjunto de cães que receberam adjuvantes nutricionais em dois momentos diferentes durante uma intervenção terapêutica de longo prazo. Todos os procedimentos envolvendo cães obedeceram aos princípios bioéticos da experimentação animal, após prévia aprovação ética do Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo CEUA-UFBA, n. 11.794/2008). Todos os responsáveis

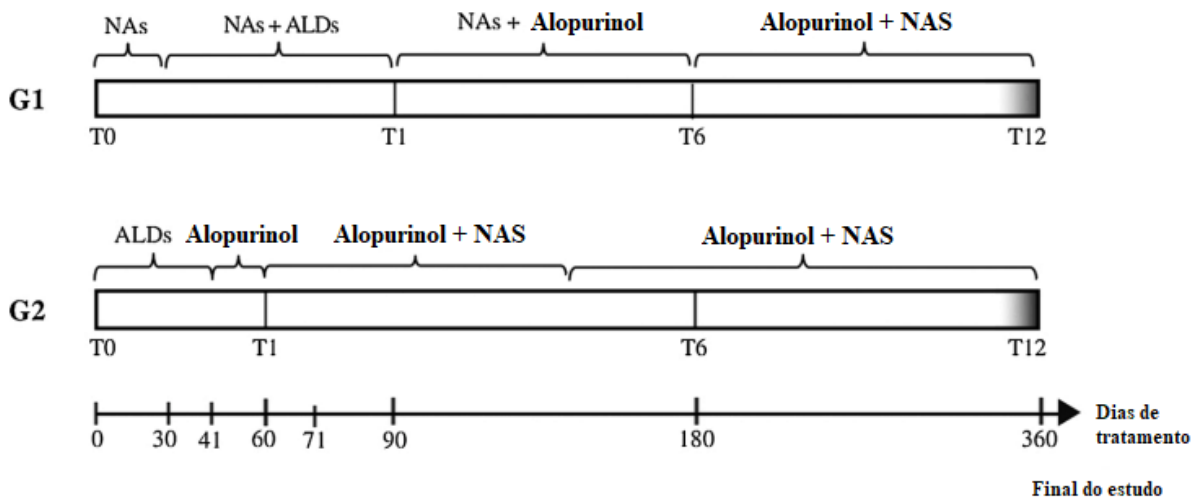
dos cães assinaram um termo de consentimento informado para que seus cães fossem incluídos no estudo.

Dezoito cães naturalmente infectados por *L. infantum* e domiciliados em área endêmica para leishmaniose zoonótica foram submetidos a diagnóstico, tratamento e monitoramento do início ao final do estudo de 12 meses. O critério de inclusão no estudo foi ser positivo para *L. infantum*, detectado por exames parasitológicos (citologia de medula óssea e/ou linfonodos) e PCR espécie-específica. Os critérios de exclusão foram ocorrência de coinfeções com outros patógenos endêmicos, como *Ehrlichia canis* ou *Babesia canis*, e/ou comorbidades, como neoplasias, doenças cardíacas ou endócrinas, antes ou durante o tratamento e monitoramento, LCan terminal e não adesão dos proprietários de cães às regras de tratamento e monitoramento. O estadiamento clínico da LCan seguiu as diretrizes da LeishVet (Solano-Gallego et al., 2011). Os cães usaram coleiras repelentes à base de deltametrina durante todo o estudo.

No início do estudo, após confirmação de infecção por *L. infantum* e estadiamento clínico, 30 cães foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, para início precoce (G1) ou tardio (G2) da administração de adjuvante nutricional (NA) no protocolo terapêutico (Figura 1). Os medicamentos anti-*Leishmania* (ALDs) utilizados foram metronidazol (25 mg/kg BID por 30 dias) associado ao cetoconazol (10 mg/kg SID por 40 dias). O leishmanostático alopurinol foi então administrado (10 mg/kg BID do dia 41 até o final do estudo) conforme descrito anteriormente (Gonçalves et al., 2020). Os adjuvantes nutricionais (NAs) consistiam em cápsulas orais de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA ômega 3: ácido eicosapentaenóico [EPA] e ácido docosa-hexaenóico [DHA] [1.000 mg/kg SID]) e uma formulação líquida oral comercial de Vitaminas B (2 gotas/kg SID) (Tabela Suplementar 1).

Os cães do G1 com adjuvantes nutricionais precoces receberam apenas NAs por 30 dias antes de iniciar os medicamentos anti-*Leishmania* (ALDs começando no dia 31); esses adjuvantes foram administrados ininterruptamente até o final do acompanhamento que ocorreu no 12º mês. Os cães do G2 com adjuvante tardio receberam apenas medicamentos anti-*Leishmania* (ALDs começando no dia 0) por 40 dias, e o alopurinol foi então administrado sozinho por 20 dias (do dia 41 ao dia 61) antes do início dos NAs, que foram adicionados a partir de dia 61 até o final do estudo. Portanto, os cães do grupo G2 atuaram como controle não-NAs durante os 61 dias anteriores à administração dos NAs. O grupo G2 forneceu assim dados para comparação com os seus próprios desde este momento (após NAs) até o 12º mês (Fig. 1).

Os dados descritos neste estudo referem-se aos únicos cães que puderam ser acompanhados desde o início (T0) até o 12º mês de acompanhamento (T12); permaneceram seis cães no G1 e 12 cães no G2 (fig. 1). Os cães foram retirados por óbito por outros motivos (n = 3), aquisição de coinfeções ou comorbidades (n = 5) e interrupção do tratamento por não adesão do dono do cão (n = 4).



**Figura 1.** Desenho experimental do estudo sobre tratamento e acompanhamento durante 12 meses de cães com leishmaniose canina adquirida naturalmente (LCan) causada por *Leishmania infantum* com adição precoce (G1) ou tardia (G2) de adjuvantes nutricionais (NAs). PUFA ômega-3 e vitaminas do complexo B no decorrer de protocolos com medicamentos anti-*Leishmania* (ALDs) metronidazol e cetoconazol, seguidos de alopurinol leishmaniostático.

## 2.2. Amostras biológicas

Aproximadamente 10 mL de sangue foram colhidos da veia jugular ou cefálica dos cães e armazenados em tubos com EDTA (BD Vacutainer, Becton Dickinson) para obtenção de sangue total para quantificação de células hematológicas, e tubos sem anticoagulante para obtenção de soros para mensurações bioquímicas e metabólicas de estresse oxidativo. Os cães dos grupos G1 e G2 foram avaliados em quatro intervalos específicos: Tempo Zero (T0), imediatamente antes do tratamento; Tempo 1 (T1), ao final do tratamento com ALDs mais 20 dias de alopurinol; e Tempos T6 e T12, respectivamente, ao final de 6 e 12 meses após T0. Portanto o T1 do grupo G1 correspondeu ao dia 90 enquanto o T1 do grupo G2 foi ao dia 60. Nos momentos T6 e T12 todos os cães de ambos os grupos receberam o mesmo protocolo terapêutico composto por alopurinol, PUFA ômega-3 e vitaminas do complexo B.

Alíquotas de urina foram colhidas para análise e realização da razão proteína/creatinina urinária (UPC). Os aspirados de medula óssea foram realizados para quantificar a carga parasitária de *L. infantum* em T0, T6 e T12, conforme descrito por Paparcone et al. (2013).

### **2.3. Diagnóstico parasitológico/ carga parasitária**

O kit comercial PureLink Genomic DNA® (Invitrogen; EUA) foi utilizado para extrair DNA da medula óssea de cães infectados em T0, T6 e T12, seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade e concentração de DNA em cada eluído foram avaliadas utilizando o espectrofotômetro L-QUANT (Loccus; São Paulo, Brasil). A PCR em tempo real foi realizada seguindo protocolo previamente descrito (Rolão et al., 2004), com adaptações para a presente pesquisa (Gonçalves et al., 2020).

### **2.4. Exame clínico para estadiamento clínico**

Os cães foram avaliados clinicamente quanto a presença de sinais clínicos compatíveis com LCan em todos os momentos do monitoramento. Os sinais observados durante o exame físico foram analisados em combinação com dados clínico-patológicos para definir o estadiamento clínico dos cães. Conforme padronizado pelo grupo LeishVet (Solano-Gallego et al., 2011), a doença apresenta quatro estádios clínicos: leve (1), moderado (2), grave (3) e muito grave (4). A definição do estadiamento clínico depende essencialmente do grau de comprometimento renal apresentado pelos cães. Cães proteinúricos (UPC > 1) são classificados no estágio 3, e cães azotêmicos (valores de creatinina > 2 mg/dL) e urêmicos, no estágio 4.

### **2.5. Hemograma, bioquímica sérica e biomarcadores séricos de estresse oxidativo**

Os parâmetros hemoglobina e hematócrito foram quantificados em aparelho hematológico específico para animais domésticos, o pocH-100iv (Diff). A morfologia celular e a presença de hematozoários foram determinadas por meio de esfregaços sanguíneos. A contagem de reticulócitos também foi determinada em esfregaços sanguíneos corados com azul cresil. Os seguintes parâmetros bioquímicos foram medidos no soro dos cães: proteínas (total, albumina, proteína C reativa, microglobulina beta-2 [Cormay; Lomianki, Polônia]), minerais (magnésio, fósforo, cálcio [Spin-react; Barcelona, Espanha]), metabólitos (uréia, creatinina, ácido úrico [Spinreact]), lipídios (lipoproteínas de densidades altas [HDL] e baixas [LDL] e triglicerídeos

[Cormay]), enzimas (gama-glutamil transferase [GGT] [Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil]), fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT) (Wiener Lab, Rosário, Argentina) utilizando o analisador bioquímico semiautomático (BioPlus-200) e o analisador automático (Prestige 24i) seguindo as recomendações dos fabricantes. Para quantificar as globulinas totais, os valores de proteína sérica total foram subtraídos dos valores de albumina e determinada sua relação (albumina/globulina - A/G). O ácido perclórico foi adicionado ao soro dos cães afim de precipitar proteínas para quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupos carbonila (expressos em nanomoles/mL de DNPH), respectivamente, com a finalidade de avaliar a peroxidação lipídica e proteica, conforme descrito na literatura (Barbosa et al., 2017). A glutathiona total, que corresponde à glutathiona oxidada e reduzida, foi medida no soro via atividade da glutathiona redutase, seguindo métodos previamente descritos (Martins et al., 2018).

Os valores de referência para parâmetros bioquímicos séricos foram fornecidos pela literatura de patologia clínica veterinária (Kaneko et al., 2008) ou estudos de grandes populações caninas saudáveis (Onishi et al., 2000; Macotpet et al., 2013; Groth et al., 2000; Macotpet et al., 2013; Groth et al., 2020).

### **2.6. Relação proteína-creatinina urinária (UPC)**

Os valores de creatinina (Wiener Lab; Rosário, Argentina) foram mensurados dos sobrenadantes urinários. Tanto a microproteína quanto a creatinina foram medidas por um analisador bioquímico semiautomático (BioPlus-200), e sua relação obtida para definir a UPC. Concomitantemente, também foi realizado exame de urina, incluindo exame microscópico de sedimento.

### **2.7. Anticorpos IgG anti-*Leishmania***

Anticorpos IgG específicos anti-*Leishmania* foram quantificados no soro conforme descrito anteriormente, utilizando o teste ELISA indireto *in house* com modificações conforme mencionado anteriormente (Gonçalves et al., 2020).

### **2.8. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 8.0 (Prism Software, Irvine, CA, EUA). O teste de Shapiro-Wilk revelou que as variáveis quantitativas estavam distribuídas de forma não paramétrica. Assim, a análise comparativa dos

dados foi realizada por meio dos testes estatísticos de Kruskal-Wallis, seguidos dos testes de Dunn ou Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ . Os dados foram expressos por mediana e percentis.

### 3. Resultados

Todos os valores medianos de cargas parasitárias de *L. infantum*, escores clínicos, hemograma, imunoglobulinas séricas anti-*Leishmania*, parâmetros bioquímicos e oxidativos, além do UPC dos cães estudados estão detalhados na Tabela Suplementar 2.

No T0, não foram observadas diferenças significativas nos valores de carga parasitária entre os cães do G1 e do G2: os valores medianos (percentil) foram 7,38 (1,3–125.431) e 1.154 (131 a 13.451), respectivamente. Perto do final do tratamento, houve uma tendência de diminuição das cargas parasitárias observadas em cães tanto do G1 quanto do G2 de T0 a T12, e essa diminuição não foi estatisticamente diferente entre os grupos. Entretanto, ao observar a frequência de cães que tiveram diminuição em seus resultados individuais (Tabela Suplementar 3) para cargas de *L. infantum*, 66,7% (4/6) dos cães do G1 exibiram tal diminuição *versus* apenas 41,7% (5/12) dos cães do G2 durante o estudo.

Antes do início do tratamento (T0), o estadiamento clínico era semelhante nos grupos G1 e G2, variando de LCan leve a moderada. No primeiro exame imediatamente ao final do tratamento com medicamentos anti-*Leishmania* (metronidazol + cetoconazol) (T1), a melhora clínica dada pelos escores foi mais substancial no G1 do que no G2 ( $p = 0,0484$ ), embora todos os cães apresentassem algum quadro clínico de melhora já após 30 dias de qualquer tratamento (Fig. 2). Os cães do G1 foram categorizados no menor estadiamento clínico de LCan. Com a continuidade do tratamento, ambos os grupos tenderam a apresentar estadios clínicos semelhantes. Aos seis e 12 meses após o início do tratamento não foi observada diferença estatística nos escores clínicos entre os cães do G1 e do G2. Os parâmetros do hemograma estavam dentro da faixa de referência na maioria dos cães do G1 e G2, independentemente do protocolo de tratamento estabelecido.

Houve diferença estatística entre G1 e G2 nos resultados de alguns parâmetros séricos, indicando efeito benéfico do uso precoce dos NAs na inflamação como observado em T1: os cães do G1 apresentaram maior redução de imunoglobulinas específicas ( $p = 0,016$ ), globulinas totais ( $p = 0,0247$ ) e proteínas totais ( $p = 0,031$ ) e relação albumina/globulina sérica aumentada ( $p = 0,0334$ ) em relação aos cães do G2 (Fig. 3). Nas avaliações aos 6 e 12 meses após o início

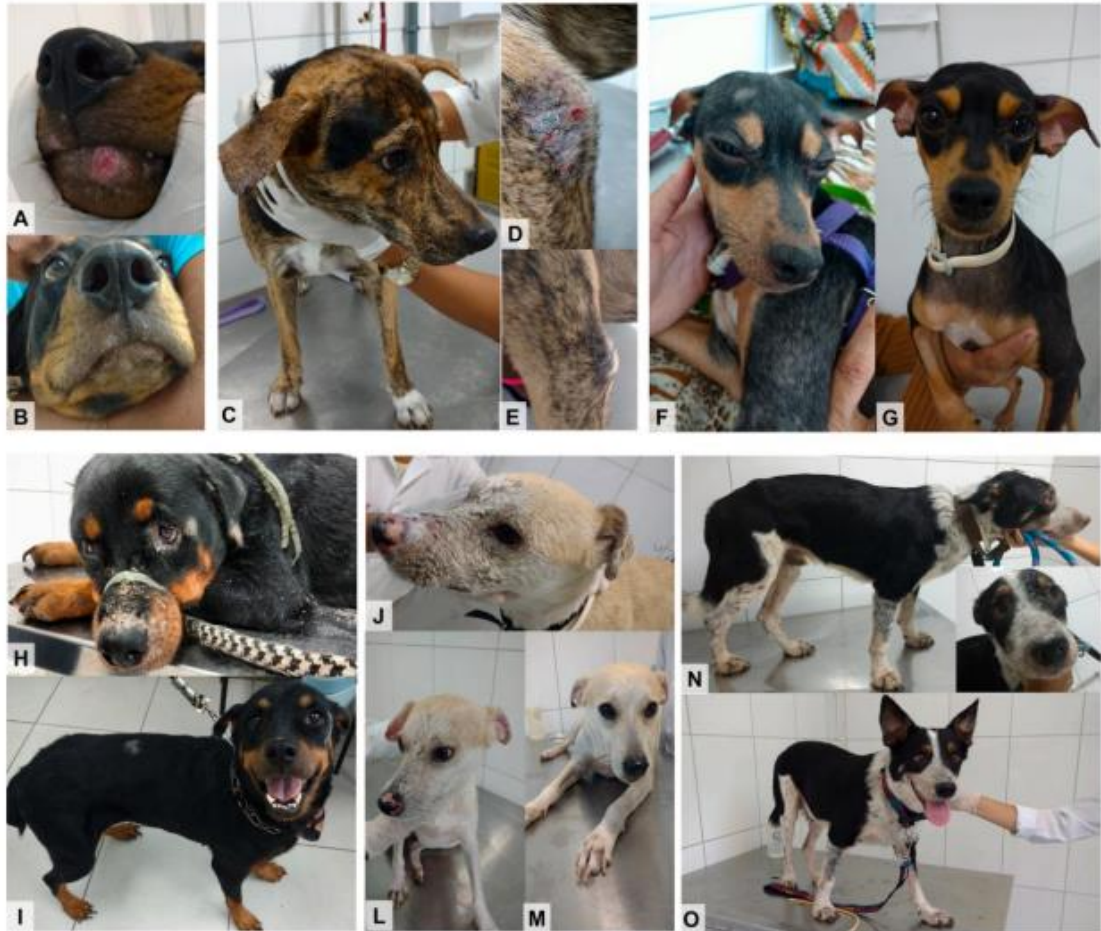
do tratamento de LCan, todos os cães já utilizavam as mesmas prescrições (alopurinol associado aos NAs). O biomarcador proteína C reativa nos cães G1 e G2 em T6 retornou ao intervalo de referência. Os valores medianos de albumina permaneceram dentro da faixa de referência nos cães do G1 durante o acompanhamento, enquanto um aumento foi observado no G2 após a adição de NAs no tratamento, em T6 ( $p = 0,016$ ) e T12 ( $p = 0,043$ ).

No T1, o TBARS (utilizado para medir a peroxidação lipídica) manteve-se em níveis equivalentes ao T0 nos cães do G1, enquanto no G2 houve diminuição estatisticamente significativa no mesmo período ( $p = 0,0028$ ) (T1). Porém, em T6, ambos os grupos passaram a apresentar diminuição equivalente nos níveis séricos de TBARS com a continuação do tratamento, indicando diminuição da oxidação lipídica. Houve diminuição da oxidação proteica a partir do T1, conforme demonstrado pela quantificação dos grupos carbonilas proteicos (expressos em nanomoles de DNPH) em ambos os grupos no T0, independente da inclusão de NAs. Nos cães do G2, os níveis séricos de glutathiona aumentaram na primeira avaliação pós-tratamento (T1), enquanto nos cães do G1, esses níveis aumentaram de forma mais significativa apenas no T6 ( $p = 0,0043$ ). Porém, com a continuação do tratamento, os parâmetros oxidativos começaram a diminuir, e os marcadores antioxidantes aumentaram em ambos os grupos até o final do estudo.

Avaliamos ainda biomarcadores relacionados às funções urinárias em ambos os grupos. Após terem recebido ALDs associadas à adição precoce (G1) ou tardia (G2) de NAs, os cães exibiram uma diminuição nas concentrações séricas medianas de ácido úrico em T6, resultando em valores finais consistentes com o intervalo de referência para valores caninos. Os cães do G2 apresentaram aumento nos níveis de magnésio no T1 ( $p = 0,0026$ ) antes do início das NAs e nas avaliações de seis e 12 meses, quando já estavam em uso de adjuvantes ( $p < 0,001$ ). Apesar da hipomagnesemia, os níveis de cálcio e fósforo estavam dentro dos limites de referência para a espécie canina na maioria dos cães do G2. No entanto, os valores de fósforo tenderam a diminuir ao longo do tempo durante o tratamento. Houve diminuição da proteinúria para valores normais na maioria dos cães do G1 e G2, seguida de diminuição da relação proteína/creatinina urinária (UPC), que foi significativa em T6 nos cães do G2 após início dos NAs ( $p = 0,0114$ ). Os parâmetros B2-microglobulina, ureia, creatinina e estavam dentro dos valores de referência em ambos os grupos em todas as avaliações.

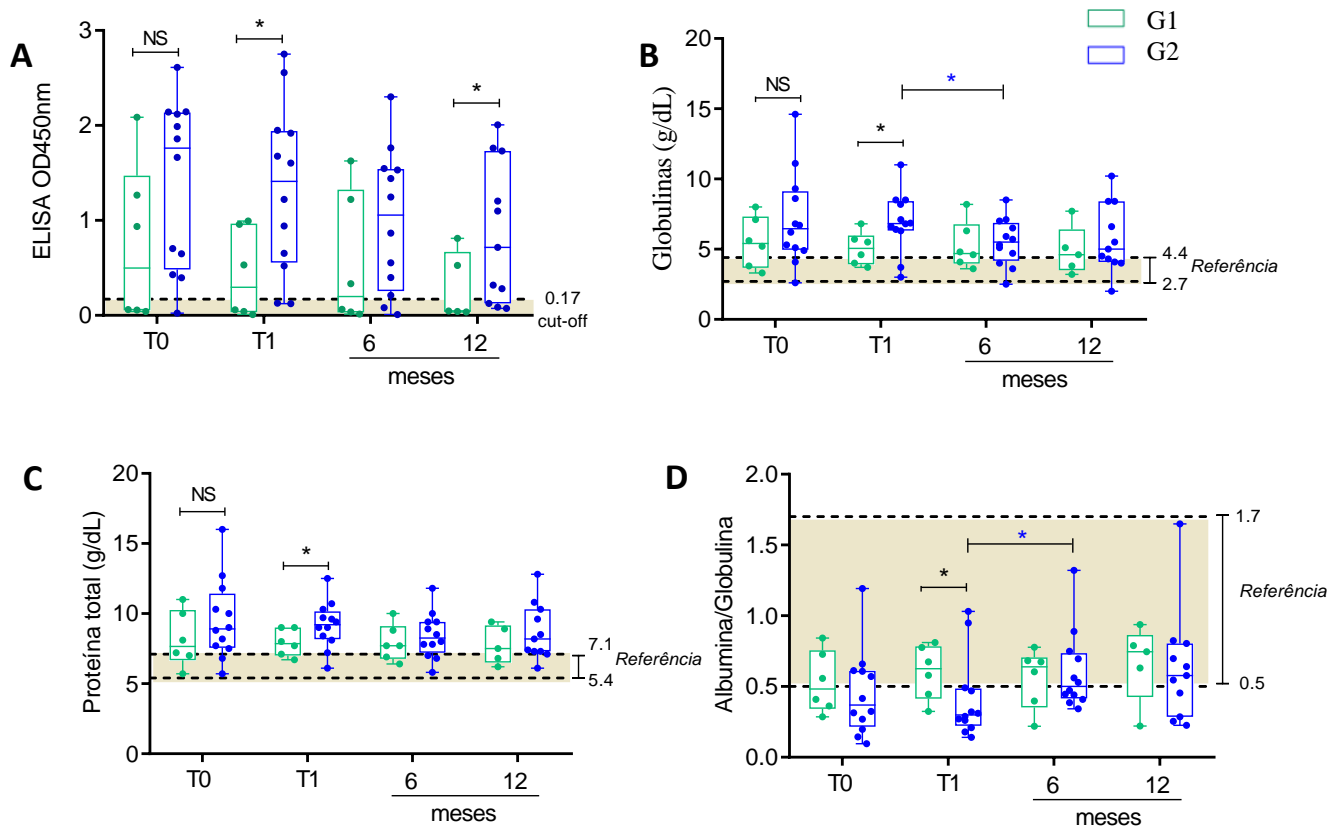
Os níveis séricos de HDL e LDL foram maiores nos cães do G1 do que nos do G2 em T1, ou seja, no final do tratamento com ALDs, enquanto os triglicérides permaneceram estáveis dentro dos valores de referência em ambos os grupos de cães durante e até o final do tratamento. O GGT diferiu ( $p = 0,0253$ ) entre os grupos a partir da primeira avaliação (T0),

com valores maiores nos cães do G2. Porém, durante o tratamento no T6, houve aumento dos níveis séricos desta enzima nos cães do G1 seguido do retorno aos valores de referência no T12.



**Figura 2.** Fotografias de cães com leishmaniose canina naturalmente infectada (LCan) antes e após tratamento com adjuvantes nutricionais (NAs) administrados precocemente (G1) ou tardiamente (G2) no decorrer de protocolos com medicamentos anti-*Leishmania* (ALDs) metronidazol e cetoconazol, seguido pelo leishmanioestático alopurinol. Fotografias de cães antes do tratamento (T0), no 30º dia de tratamento (T30) ou no 180º dia de tratamento (T180). Cães do G1, Rottweiler em T0 (A) e T30 (B); SRD em T0 (C,D) e T30 (E); SRD em T0 (F) e T30 (G): os cães do G1 receberam no T30 apenas adjuvantes nutricionais (PUFA ômega-3 e vitaminas B) durante 30 dias. Cães do G2, Rottweiler em T0 (H: este cão teve o focinho amarrado por agressividade, notadamente relatado na anamnese como comportamento anormal até mesmo com familiares) e T30 (I); SRD em T0 (J) e T30 (L); Australian Short-haired Cattle Dog em T0 (N) e T30 (O): os cães do G2 receberam em T30 apenas ALDs durante 30 dias. Este cão SRD G2 (M) recebeu em T180 o curso completo de 40 dias de ALD e estava atualmente recebendo alopurinol (adicionado a partir do dia 41) e adjuvantes nutricionais (PUFA ômega-3 e vitaminas B) adicionados a partir do dia 60 (para comparar com J e L).

**Figura 3** Melhoria dos marcadores inflamatórios em cães aos quais foram administrados adjuvantes nutricionais (NAs) precoces (G1) ou tardios (G2) no curso do tratamento para leishmaniose canina naturalmente adquirida (LCan) com medicamentos anti-*Leishmania* (ALDs) metronidazol e cetoconazol, seguidos pelo alopurinol. Cães com LCan do grupo G1, cujo tratamento inicial foi NAs (PUFA ômega-3 e vitaminas B), apresentaram menores valores de imunoglobulinas específicas (A) e globulinas totais (B), proteínas séricas totais (C), e retornaram a normalidade da relação A/G (D) em T1 quando comparado com G2. Dados em medianas e percentis. \* $p < 0,05$ .



**Tabela suplementar 1.** Composição e quantidade de cada substância que compunha os adjuvantes nutricionais (nutracêuticos ômega 3 e vitaminas do complexo B) consumidos juntamente aos fármacos anti-*Leishmania*, metronidazol e cetoconazol, e o alopurinol, pelos cães tratados com LCan e monitorados durante 12 meses.

COMPOSIÇÃO	PUFA Ômega 3	Complexo B
EPA (mg/cápsula)	360	
DHA (mg/cápsula)	240	
Cianocobalamina (VitB12) ( $\mu\text{g/mL}$ )		1,5
Pantotenato de cálcio (mg/mL)		3
Riboflavina (VitB2) (mg/mL)		2
Tiamina (VitB1) (mg/mL)		5
Cloridrato de piridoxina (VitB6) (mg/mL)		2
Nicotinamida (VitB3) (mg/mL)		20

*Legenda:* PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico.

**Tabela Suplementar 2.** Valores dos parâmetros hematológicos, bioquímicos, de estresse oxidativo e de carga parasitária dos cães portadores de leishmaniose canina naturalmente adquirida submetidos ao tratamento com os fármacos metronidazol, cetoconazol e alopurinol e adjuvantes nutricionais PUFA ômega 3 e vitaminas do complexo B. Dados em mediana. Dados significativos quando  $p < 0,05$ . G1: cães consumidores dos adjuvantes nutricionais prévios; G2: cães que utilizaram somente os fármacos previamente.

Hematologia	T0 G1	T0 G2	<i>p</i> T0 G1 vs T0 G2	T1 G1	T1 G2	<i>p</i> (T1 G1 vs T1 G2)	T6 G1	T6 G2	<i>p</i> T6 G1 vs T6 G2	T12 G1	T12 G2	<i>p</i> T12 G1 vs T12 G2	<i>p</i> (Different times in the same group)	RV
Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	6.4 (5.6-7.7)	5.6 (4.4- 6.7)	0.0753	6.4 (5.3-6.9)	5.6 (4.7-6.8)	0.2247	6.4 (5.3-7.3)	6.4 (5.4-6.8)	0.4100	6.7 (5-7.1)	6.3 (4.6-7.4)	0.4904	NS*	5.5-8.5
Hemoglobina (g/dL)	14.1 (11-15.3)	11.9 (8.7-14)	0.1978	13.7 (11.2-15)	12.5 (8.8-14)	0.2257	13.3 (11.4-16)	13.8 (11.8-16)	0.4017	13.1 (10.2-15)	14.0 (9.7-16)	0.4043	NS	12-18
Hematocrito (%)	43.0 (34-47)	33.0 (27-45)	0.1248	43.0 (34.7-46)	37.5 (28-44)	0.1244	41.7 (34-48)	42.6 (36-47)	0.4373	40 (32-46)	45.2 (29-50)	0.3029	NS	37-55
Plaquetas ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	256.5 (213-432)	210.0 (169-291)	0.1096	285.0 (227-434)	217.0 (191-275)	0.0589	230.5 (183-398)	217.7 (171-284)	0.3410	262.0 (227-376)	219.0 (184-234)	0.0453	NS	166 - 575
Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	10.0 (7-22)	7.3 (6.5-9.3)	0.0599	13.8 (6.9-22)	8.6 (6-11.8)	0.1064	13.4 (8.3-22)	8.9 (6.6-10)	0.1023	11.4 (8-13)	7.8 (6-11.6)	0.1598	NS	6-17
Neutrófilos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	<b>9.5</b> (6.2-16)	<b>5</b> (3.6-6.3)	<b>0.0122</b>	8.1 (4.6-20)	5.0 (4.1-9.6)	0.1064	<b>10.1</b> (6.1-18)	<b>5.7</b> (4.2-7)	<b>0.0334</b>	7.3 (5.4-9.2)	5.2 (3.6-7.7)	0.1106	NS	3-11.8
Linfócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	2.6 (1-4.4)	1.5 (0.6-2.3)	0.1064	1.8 (0.5-3.8)	1.8 (0.4-2.4)	0.2766	1.6 (0.9-2)	1.7 (1.4-2.5)	0.2398	2.1 (1.4-2.4)	1.8 (0,3-2)	0.1106	NS	1-4.8
Monócitos (/mm <sup>3</sup> )	<b>592</b> (463-840)	<b>339</b> (212-625)	<b>0.0334</b>	870 (282-1.368)	436 (173-731)	0.0623	447 (321-1.137)	363 (145-614)	0.1454	684 (283-901)	240 (109-450)	0.0902	NS	150-1350
Reticulocytes (/mm <sup>3</sup> )	58480 (38355- 80543)	43355 (18008- 49710)	0.0512	75020 (58465- 230760)	73800 (53840- 138620)	0.3986	52475 (24405- 94560)	39920 (24450- 58960)	0.1751	42780 (28730- 89500)	28120 (17490- 38100)	0.0696	<b>T0 vs T1 G2 (0.0022);</b>	>60000

													T1 vs T6 G2 (0.0021)	
Bioquímica	T0 G1	T0 G2	<i>p</i> T0 G1 vs T0 G2	T1 G1	T1 G2	<i>p</i> T1 G1 vs T1 G2	T6 G1	T6 G2	<i>p</i> T6 G1 vs T6 G2	T12 G1	T12 G2	<i>p</i> T12 G1 vs T12 G2	<i>p</i> (Different times in the same group)	RV
Proteínas totais (g/dL)	7.6 (6.6-7.6)	8.9 (7.5-11.4)	0.1616	7.8 (7-9)	9.2 (8.1-10)	0.0310	7.7 (6.7-9)	8.2 (7.2-9.4)	0.2004	7.5 (6.5-9.1)	8.2 (7.3-10.3)	0.2461	NS	5.4-7.1
Albumina (g/dL)	2.9 (2.2-3)	2.3 (1.8-3)	0.1966	3.0 (2.3-3.1)	2.1 (1.8-3)	0.0622	<b>2.6</b> (2.2-2.9)	<b>2.9</b> (2.6-3.2)	<b>0.0436</b>	3.0 (2.3-3.4)	3.0 (2.6-3.3)	0.4464	T1 vs T6 G2 (0.023); T1 vs T12 G2 (0.0403); T0 vs T6 G2 (0.016); T0 vs T12 (0.0434)	2.6-3.3
Globulinas (g/dL)	5.4 (3.6-7.3)	6.4 (4.9-9.1)	0.2185	<b>5.05</b> (3.9-5.9)	<b>6.8</b> (6.3-8.4)	<b>0.0247</b>	4.7 (3.9-6.7)	5.5 (4.1-6.8)	0.3175	4.6 (3.5-6.4)	5.0 (4.1-8.4)	0.2477	NS	2.7-4.4
Razão A/G	0.48 (0.34-0.75)	0.36 (0.21-0.6)	0.2185	<b>0.62</b> (0.41-0.78)	<b>0.30</b>	<b>0.0334</b>	0.63 (0.35-0.70)	0.5 (0.41-0.73)	0.5000	0.74 (0.42-0.86)	0.57 (0.28-0.8)	0.3306	T1 vs T6 G2 (0.0121)	0.5-1.7
Proteína C reativa (mg/L)	<b>0.1</b> (0.1-0.4)	<b>0.3</b> (0.1-0.5)	<b>0.0219</b>	<b>0.1</b> (0.06-0.1)	<b>0.3</b> (0.2-1.2)	<b>0.0076</b>	0.2 (0.04-0.3)	0.19 (0.06-0.2)	0.2988	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.1-0.3)	0.3810	T0 vs T6 G2 (0.0043)	0-1 <sup>†</sup>
Fósforo (mg/dL)	3.7 (2.1-4.2)	4.6 (3.6-4.9)	0.0623	3.7 (3.1-4.7)	3.9 (3.1-4.7)	0.4458	3.0 (1.6-4.5)	2.8 (2.3-3.5)	0.3668	2.5 (2.1-3.8)	2.9 (2.4-3.5)	0.2548	T0 vs T6 G2 (0.0053); T1 vs T12 G2 (0.0078)	2.5-6.8
Creatinina (mg/dL)	0.9 (0.8-1.2)	1.0 (0.8-1.4)	0.3997	1.2 (0.8-1.6)	1.1 (0.9-1.2)	0.2661	1.1 (0.7-1.4)	1.0 (0.8-1.4)	0.4907	0.9 (0.7-1.8)	1.0 (0.8-1.3)	0.4400	NS	0.5-1.5
Ureia (mg/dL)	35 (26-44)	30 (22-50)	0.4364	30 (23-40)	31 (22-37)	0.4458	30 (24-39)	29 (26-34)	0.4366	33 (16-57)	29 (23-36)	0.3608	NS	15-40
Ácido úrico (mg/dL)	4.0 (1.1-7.5)	2.4 (1.6-2.9)	0.2533	1.7 (1.4-3.5)	3.3 (1.2-4)	0.2839	1.05 (0.7-1.3)	0.9 (0.8-1.3)	0.4357	<b>0.8</b> (0.8-1.1)	<b>1.3</b> (0.9-1.7)	<b>0.0339</b>	T0 vs T6 G1 (0.0195); T1 vs T6 G2 ( $<0.0001$ )	0-2
TBARS (nmol/mL)	6.4 (5-9.6)	6.2 (5-7.6)	0.2406	<b>6.7</b> (6-7.5)	<b>3.7</b> (2.5-5.2)	<b>0.0014</b>	3.9 (3-4.4)	4.2 (3.2-4.7)	0.2686	1.5 (1.3-4.3)	3.3 (1.3-4)	0.4430	T0 vs T6 G1 (0.0011); T0 vs T1 G2 (0.0052)	2.34- 3.56 <sup>‡</sup>
Bioquímica	T0 G1	T0 G2	<i>p</i> T0 G1 vs T0 G2	T1 G1	T1 G2	<i>p</i> T1 G1 vs T1 G2	T6 G1	T6 G2	<i>p</i>	T12 G1	T12 G2	<i>p</i>	<i>p</i>	RV

									<i>T6 G1 vs T6 G2</i>			<i>T12 G1 vs T12 G2</i>	(Different times in the same group)	
DNPH (nmol/mL)	18.1 (13-25)	18.7 (11-24)	0.4100	11.0 (10-13)	9.0 (8-13)	0.1248	9.8 (2-24)	15.5 (10-20)	0.3841	8.3 (2-16)	5.4 (2-8)	0.4135	T0 vs T1 G1 (0.0076); T0 vs T1 G2 (0.0028)	10.5 (9.1-14.6) <sup>Ω</sup>
Glutathione (µg/mL)	<b>1.3</b> (0.7-2.1)	<b>0.68</b> (0.3-1.1)	<b>0.0334</b>	1.0 (0.7-1.8)	1.7 (0.5-2.9)	0.2698	3.6 (2.4-4.5)	2.6 (0.8-4.5)	0.2766	1.2 (0.3-82)	1.16 (0.09-1.3)	0.2910	T1 vs T6 G1 (0.0043); T0 vs T1 G2 (0.0161)	1.71-2.43
Magnesium (mg/dL)	<b>1.96</b> (1.5-2.3)	<b>1.5</b> (1.5-1.6)	<b>0.0202</b>	2.0 (1.7-2.3)	1.8 (1.7-1.8)	0.0593	1.9 (1.6-2.2)	1.7 (1.6-2)	0.3168	<b>2.2</b> (2.1-2.4)	<b>1.7</b> (1.7-2)	<b>0.0005</b>	T0 vs T1 G2 (0.0026) T0 vs T6 G2 (0.0003)	1.8-2.4
Calcium (mg/dL)	15.8 (15.4-16)	16.0 (15-17)	0.3751	15.0 (14-15)	15.2 (14-15.7)	0.3410	14.3 (12-16)	15.9 (14-16)	0.0973	14.6 (12-15)	15.0 (14-15.9)	0.1667	T0 vs T1 G2 (0.0166); T0 vs T12 G2 (0.0211)	3-19.3 <sup>§</sup>
HDL (mg/dL)	49.5 (36-73)	49.4 (28-65)	0.2766	<b>76.8</b> (55-106)	<b>47.5</b> (27-79)	<b>0.0415</b>	102.2 (63-152)	108.7 (74-152)	0.4818	149.7 (98-165)	131.7 (81-154)	0.2917	T0 vs T6 G2 (0.0001); T0 vs T6 G1 (0.0130)	33-120
LDL (mg/dL)	63.6 (53-93)	71.7 (46-109)	0.5000	<b>107.7</b> (78-149)	<b>75.0</b> (39-94)	<b>0.0401</b>	60.7 (38-135)	74.8 (40-103)	0.5000	<b>100.6</b> (78-159)	<b>64.9</b> (50-89)	<b>0.0137</b>	NS	43-179.7
Triglycerides (mg/dL)	55 (50-70)	63.9 (52-78)	0.2185	68.2 (60-85)	83 (60-97)	0.3082	64 (57-128)	77.8 (58-82)	0.4458	65.4 (58-112)	90 (58-100)	0.5000	NS	20-112
ALT (UI/L)	49 (30-56)	46 (35-53)	0.3833	66 (26-81)	46 (33-55)	0.2394	58 (28-149)	50 (36-60)	0.4454	62 (28-115)	36 (26-47)	0.1648	T6 vs T12 G2 (0.0495)	21-102
FA (UI/L)	80 (48-190)	85.5 (56-132)	0.5000	48 (34-152)	64 (47-99)	0.1668	71 (45-753)	46.5 (34-89)	0.1110	76 (51-228)	100 (72-159)	0.2917	T0 vs T6 G2 (0.0330) T6 vs T12 G2 (0.0134)	20-156
GGT (U/L)	<b>4.9</b> (1.1-5.5)	<b>6.6</b> (4.6-7.6)	<b>0.0253</b>	5.5 (5.1-8.2)	5.5 (4.4-7.4)	0.4354	<b>8.25</b> (5.5-12.4)	<b>5.5</b> (3.3-7.7)	<b>0.0292</b>	3.3 (1.6-5.5)	4.4 (2.2-8.8)	0.1777	T6 vs T12 G1 (0.0087)	1.2-6.4
Glucose (mg/dL)	84.65 (70-106)	89.4 (78-103)	0.3082	86.2 (54-105)	90.1 (83-96)	0.4458	<b>77.9</b> (62-85)	<b>91.4</b> (81-98)	<b>0.0264</b>	84.4 (77-95)	82.3 (75-99)	0.4565	NS	65-118
Lactate (mg/dL)	17.2 (14-21)	15.6 (12-19)	0.0899	17.7 (12-21)	13.8 (11-17)	0.1942	19.2 (12-27)	14.2 (13-17)	0.0753	15.7 (15-18)	15.5 (13-19)	0.4025	NS	5-25
B2-microglobulin (mg/L)	0.25 (0.1-0.5)	0.2 (0.2-0.3)	0.2748	0.20 (0.1-0.2)	0.2 (0.1-0.3)	0.1488	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.1-0.2)	0.2488	0.3 (0.2-0.3)	0.2 (0.2-0.3)	0.1170	NS	0.2 (0.1-0.2) <sup>Ω</sup>

Biochemistry	T0 G1	T0 G2	<i>p</i> T0 G1 vs T0 G2	T1 G1	T1 G2	<i>p</i> T1 G1 vs T1 G2	T6 G1	T6 G2	<i>p</i> T6 G1 vs T6 G2	T12 G1	T12 G2	<i>p</i> T12 G1 vs T12 G2	<i>p</i> (Different times in the same group)	RV
UPC ratio	0.2 (0.08-0.5)	0.5 (0.1-0.7)	0.1812	0.1 (0.05-0.1)	0.1 (0.1-0.6)	0.1327	0.1 (0.08-0.9)	0.1 (0.05-0.3)	0.1582	0.12 (0.05-0.5)	0.3 (0.1-0.6)	0.2028	T0 vs T6 G2 (0.0114)	0.5 <sup>¶</sup>
Sorologia	T0 G1	T0 G2	<i>p</i> T0 G1 vs T0 G2	T1 G1	T1 G2	<i>p</i> T1 G1 vs T1 G2	T6 G1	T6 G2	<i>p</i> T6 G1 vs T6 G2	T12 G1	T12 G2	<i>p</i> T12 G1 vs T12 G2	<i>p</i> (Different times in the same group)	RV
ELISA (OD) – Anticorpo IgG anti- <i>Leishmania</i>	0.4988 (0.052- 1.472)	1.761 (0.484- 2.136)	0.0899	<b>0.2955</b> (0.0335- 0.9671)	<b>1.412</b> (0.5553-1.942)	<b>0.0160</b>	0.1980 (0.0307-1.323)	1.056 (0.2573- 1.542)	0.1064	<b>0.04550</b> (0.03875- 0.6695)	<b>0.7165</b> (0.1270- 1.732)	<b>0.0343</b>	NS	> 0.17
Carga Parasitária	T0 G1	T0 G2	<i>p</i> T0 G1 vs T0 G2	T1 G1	T1 G2	<i>p</i> T1 G1 vs T1 G2	T6 G1	T6 G2	<i>p</i> T6 G1 vs T6 G2	T12 G1	T12 G2	<i>p</i> T12 G1 vs T12 G2	<i>p</i> (Different times in the same group)	RV
Medula Óssea (n <i>Leishmania</i> /mL)	7.38 (1.3- 125431)	1,154 (131- 13451)	0.0745	-	-	-	138.8 (0.8- 189533)	2177 (10- 23342)	0.3409	0.77 (0.19- 339884)	605.1 (2.1- 169320)	0.1328	NS	-
Clinical staging	T0 G1	T0 G2	<i>p</i> T0 G1 vs T0 G2	T1 G1	T1 G2	<i>p</i> T1 G1 vs T1 G2	T6 G1	T6 G2	<i>p</i> T6 G1 vs T6 G2	T12 G1	T12 G2	<i>p</i> T12 G1 vs T12 G2	<i>p</i> (Different times in the same group)	RV
Estadio Clínico	1.5 (1-2)	2 (2-2)	0.0833	<b>1</b> (1-2)	<b>2</b> (2-2)	<b>0.0484</b>	2 (1-2)	2 (1-2)	0.5000	1 (1-2.5)	2 (1-2)	0.3574	NS	-

Dados expressos como mediana com percentis (25 –75%). A significância foi atribuída em  $p < 0,05$ ; valores estatisticamente significativos em negrito. \*NS= não significativo.

G1: cães que receberam adjuvantes nutricionais precocemente (30 dias antes do início das drogas anti-*Leishmania*); G2: cães que receberam adjuvantes nutricionais tardios (60 dias após o início das drogas anti-*Leishmania*);

VR - Valor de referência para cães para hemograma e bioquímica sérica. Fonte: Kaneko et al. (2008);

Valor de referência: †(Onishi et al., 2000); ‡(Macotpet et al., 2013); §(Groth et al., 2020); ¶UPC <0,5 Cães saudáveis; Limite 0,5-1,0; > 1,0 Proteinúria glomerular. Fonte: ÍRIS, (2016); Ω Valores obtidos dos cães saudáveis do estudo.

T0: antes do tratamento; T1: tratamento final com medicamentos anti-*Leishmania* (G1 = dia 90, G2 = dia 60); T6: 180 dias, T12: 356 dias. relação A/G: relação albumina/globulina; TBARS:

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (peroxidação lipídica); DNPH: dinitrofenilhidrazina (peroxidação proteica); HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; ALT: alanina aminotransferase; AF: fosfatase alcalina; GGT: gama glutamil transferase; UPC: relação proteína-creatinina urinária.

Valores numéricos em negrito apresentaram significância estatística ( $p < 0,05$ ).

**Tabela Suplementar 3.** Dados individuais de 18 cães do estudo que receberam adjuvantes nutricionais (NAs) precocemente (G1=6, do n.1 ao n.6) ou tardiamente (G2=12, do n.7 ao n.18) no curso de protocolos de tratamento para leishmaniose canina naturalmente adquirida (LCan) causada por *Leishmania infantum* incluindo medicamentos anti-*Leishmania* (ALDs) metronidazol e cetoconazol, seguidos do leishmaniostático alopurinol, e monitorados durante 12 meses.

Dogs	Time points	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
		G1						G2												
Estadiamento Clínico	T0	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	T1	2	1	1	2	1	1	1	3	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	T6	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2
	T12	-	3	1	1	2	1	2	2	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	-
ELISA (OD) – Anticorpo IgG anti- <i>Leishmania</i>	T0	0.936	12.665	2.087	0.042	0.0615	0.0565	0.649	2.61	21.425	0.023	0.429	21.195	0.3955	19.885	0.7045	16.645	1.858	21.415	
	T1	0.5315	0.993	0.9585	0.0095	0.0415	0.0595	0.6535	27.505	1.221	0.1275	0.5225	1.603	0.123	1.949	0.9405	1.677	2.556	1.919	
	T6	0.333	1.222	16.265	0.0135	0.0365	0.063	14.415	17.635	15.315	0.0095	0.2105	1.545	0.082	0.867	0.5525	0.3975	2.302	12.455	
	T12	-	0.8115	0.5275	0.0415	0.0455	0.036	1.203	2.007	1.761	0.0865	0.127	1.732	0.0745	0.7165	0.319	0.282	1.098	-	
Carga parasitária †	T0	13	487867	4619	0.8	1.5	1.5	1154	-	13451	21	9008	131	13	16983	139704	9486	434	320	
	T1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	T6	75930.1	530343	275.4	1.1	2.2	0	3042.5	2396.3	193559	0	679.3	158623.1	3.4	30.1	19419	0	24649.3	1957.5	
	T12	-	679765	1.5	0.8	0.4	0	27427.1	169320	1680895.5	0	2.3	619.4	2.7	2.2	533625	0	605.1	-	
Eritrócito (x10 <sup>6</sup> /μL)	T0	6.44	4.4	7.21	6.1	6.48	9.21	6	4.3	6.35	7.06	3.3	4.54	7.74	6.85	4.79	5.65	2.8	5.62	
	T1	7.43	5.41	6.82	5.2	6	6.8	6.85	4.68	6.90	7.72	5.88	4.26	7.08	6.38	5.01	5.40	4.9	3.5	
	T6	5.46	4.9	5.97	6.9	6.8	8.5	6.4	7.7	6.6	8.15	5.6	4.9	6.8	6.5	4.3	6.6	6.1	5.36	
	T12	-	4.67	7.3	5.5	6.7	6.9	5.5	7.43	4.69	7.55	7.03	3.03	6.7	7.43	4.12	6.35	5.83	-	
Hemoglobina (g/dL)	T0	13.7	8.6	14.6	11.8	14.6	17.4	11.8	8.7	12.8	16.5	5.7	8.7	18.2	15.1	10.1	13.2	6.6	12	
	T1	16	11.1	14.6	11.3	13.2	14.3	13.4	9.1	14.3	18.4	6.6	8.8	17.1	13.6	11.2	12.1	11.7	8.5	
	T6	12	9.7	12.6	14	16.2	16.5	13.5	16.3	13.9	19.4	12.8	10.9	15	15	9.1	16.6	13.7	11.5	
	T12	-	8.5	14.6	12	16	13.1	11.2	16	9.7	17.5	14.6	6.9	14	16	8.6	16	12.8	-	
Hematócrito (%)	T0	42	26	45	36.7	44	54.6	36.5	27.4	38.2	49.9	19.8	27.2	53.4	47.3	30	29.5	20.5	36	
	T1	49	34	44	35	42	45	41.9	28.4	44.7	55.5	25.9	27.8	51.8	41.5	34	41	34	25	
	T6	35	31.3	39	44.5	47.6	51	40	49	43.5	56	37	33.2	45	45	29.8	48.1	41.7	35.6	

	T12	-	26.5	44	37	48	40	36	50	28.8	51.6	45.2	21.7	46	50	27.7	48	39.1	-
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	T0	180	393	234	550	279	223.5	113	180	165	201.6	276	296	186	235	78	218	468	310
	T1	230	219	241	329	410	505	205	-	264	-	442	220	209	256	310	214	148	46.5
	T6	202	199	135	382	259	445	145	223	190	188	288	274	397	348	165	252	160	212.4
	T12	-	262	255	323	200	429	184	219	226	153	219	391	284	219	126	200	234	-
Leucócitos (/μL)	T0	16000	9200	8700	23200	21200	10900	10500	6400	7100	7300	8100	11100	6900	4300	4200	7300	8400	9.7
	T1	17300	7200	6100	36400	10300	17500	8100	5700	11900	13100	11500	7700	9200	5200	5400	11600	13500	6900
	T6	20200	8300	8300	17400	17300	9600	10200	7800	6500	9000	27200	12500	10400	7100	1700	6.300	88000	10400
	T12	-	9200	6600	13100	12700	11400	7500	3500	13200	78000	14200	11600	6000	6500	2300	8500	10900	-
Linfócitos (/μL)	T0	4480	1196	4176	464	4452	1199	3780	1152	1917	584	2106	1887	2415	172	42	1022	672	2522
	T1	4671	648	2745	364	3605	875	1782	456	1904	1310	2530	1925	2668	468	540	232	2160	3726
	T6	1818	996	1494	171	1730	2880	2448	1716	1560	1980	5168	1875	3744	1349	357	756	2640	1560
	T12	-	1656	2310	1310	2667	2166	3075	315	1980	1248	1982	928	1860	325	207	1955	2180	-
Globulina (g/dL)	T0	3.3	5.6	8	7.1	5.2	3.8	4.9	14.6	9.3	2.6	5.3	11.1	5.1	6.2	6.8	6.7	8.6	4.1
	T1	4.6	6.8	3.7	5.5	5.7	4	3.7	11	8.2	3	6.3	8.5	6.4	7.1	6.8	8.5	6.85	6.6
	T6	4.8	8.2	6.3	4.1	4.6	3.6	4.7	7	8.51	2.5	5.9	5.7	7.1	3.6	5.1	4	6.5	5.3
	T12	-	7.7	3.8	4.6	5.1	3.2	5	8.4	8.4	2	5.5	10.2	6.6	4.3	4.1	4	4.5	-
Albumina (g/dL)	T0	2.4	1.6	2.9	2.9	2.9	3.2	2.8	1.4	2.5	3.1	2.2	1.6	3.1	3.8	2.2	2.1	1.7	2.7
	T1	3.1	2.2	3	2.45	3.3	3.1	3.5	1.5	1.5	3.1	1.8	1.8	3	3.5	2.2	2.2	2.15	1.8
	T6	2.9	1.8	2.5	2.8	3.1	2.8	3.27	2.4	3.29	3.3	2.6	3.2	2.9	3.2	2.7	3	2.9	2.5
	T12	-	1.7	3	2.9	3.8	3	3.2	2.4	1.9	3.3	3	2.6	3	3	3.3	3.3	2.6	-
Razão A/G	T0	0.7	0.3	0.4	0.4	0.6	0.8	0.6	0.1	0.3	1.2	0.4	0.1	0.6	0.6	0.3	0.3	0.2	0.7
	T1	0.7	0.3	0.8	0.4	0.6	0.8	0.9	0.1	0.2	1	0.3	0.2	0.5	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3
	T6	0.6	0.2	0.4	0.7	0.7	0.8	0.7	0.3	0.4	1.3	0.4	0.6	0.4	0.9	0.5	0.8	0.4	0.5
	T12	-	0.2	0.8	0.6	0.7	0.9	0.6	0.3	0.2	1.6	0.5	0.3	0.5	0.7	0.8	0.8	0.6	-
Proteínas Totais (g/dL)	T0	5.7	7.2	11	10	8.1	7	7.7	16	11.8	5.7	7.5	12.7	8.2	10	9	8.8	10.3	6.8
	T1	7.7	9	6.7	8	9	7.1	7.2	12.5	9.7	6.1	8.1	10.3	9.4	10.6	9	10.7	9	8.4
	T6	7.7	10	8.8	6.9	7.7	6.4	8	9.4	11.8	5.8	8.5	8.9	10	6.8	7.8	7	9.4	7.8
	T12	-	9.4	6.8	7.5	8.9	6.2	8.2	10.8	10.3	5.3	8.5	12.8	9.6	7.3	7.4	7.3	7.1	-
GGT (U/L)	T0	5.5	4.4	1.1	5.5	1.2	5.5	6.6	7.4	7.7	7.3	5.5	5.5	6.6	8.8	4.4	7.7	3.3	1.2

	T1	5.5	4.4	5.5	13.3	6.6	5.4	5.5	7.7	4.4	8.8	13.3	4.4	4.4	4.4	6.6	6.7	5.55	2.2
	T6	12.2	8.8	7.7	5.5	5.5	13.3	3.4	3.3	4.4	7.7	9.9	5.5	-	8.8	6.6	3.3	3.3	5.5
	T12	-	3.3	1.1	6.6	4.4	2.2	5.5	2.2	4.4	7.7	8.8	4.4	1.1	9.9	12.2	2.2	2.2	-
ALT (UI/L)	T0	33	47.1	24.9	62	51	55	71	54	33	103	41	30	47	42	46	22	50	49
	T1	26	26	81	78	54	83	52	36	78	55	27	55	39	33	26	52	78	40
	T6	188	21	31	136	65	52	57	47	226	36	35	94	62	53	41	36	54	36
	T12	-	31	151	62	80	26	21.1	31	78	26	36	47	47	41	141	26	27	-
FA (U/L)	T0	149	80	33.8	287	62	94	116	49	116	141	56	114	57	57	56	150	40	138
	T1	30	59	36	413	37	66	103	86	114	54	122	37	47	47	47	74	82	37
	T6	2450	51	28	188	67	75	41	66	128	25	46	32	75	42	15	94	47	129
	T12	-	94	47	362	56	76	125	37	216	86	190	72	71	103	159	100	74.2	-
Creatinina (mg/dL)	T0	1	0.9	1.1	0.8	0.9	1.7	1.4	0.8	1	1.1	1.4	0.7	1.4	0.8	0.8	1.8	1.6	1
	T1	1.4	1.1	1.6	0.6	1.8	0.9	1.2	1.3	0.9	1.1	1.5	0.7	1.3	1.1	0.7	1.2	1.2	0.9
	T6	1.2	1.3	1.9	0.5	0.8	1.1	1.5	1	1	0.7	1.5	0.7	1.4	1.1	0.9	1.2	1.6	0.8
	T12	-	1.5	2.1	0.6	0.9	0.9	1	1.3	1	1.3	1.3	0.8	0.9	0.7	0.7	1.1	1	-
Ureia (mg/dL)	T0	33.5	37.9	15.8	30.3	42.7	48	68.3	20.4	22.3	28	50	22.2	32.8	19.8	29	31	89	50
	T1	27.1	33.2	36	23	23.8	53	38	21	35.1	30	29	21.1	33	22.2	23.7	60	74	32
	T6	38.5	31.2	29	25	21	41	35	32	10.4	35	29	26.3	29	28	29.4	26	80	27
	T12	-	33	73	16	17	41	39	18	11	31	31	23	29	27	24	46	36	-
HDL (mg/dL)	T0	38.2	45.1	30.7	53.9	70.8	82.8	66	27.2	25.7	82.2	47.5	20.2	64.1	35.1	51.3	33.4	55.8	68.2
	T1	42.9	60	102.8	72.2	117.4	81.5	53.8	15.4	60.6	85	61.7	20.4	40.9	41.3	24.9	34.2	87.7	102.4
	T6	98.5	59.5	64.6	166.6	147.2	105.8	96	47.6	73.1	122.8	78.7	100	52.1	146.1	117.4	169.2	159.3	154.5
	T12	-	99.5	165.6	149.7	165.8	98.1	128.6	81.2	80.3	176.8	128.1	78.1	136.5	150.7	154.4	156.8	131.7	-
Ácido úrico (mg/dL)	T0	5.1	6.8	2.9	9.7	1.2	1	2.8	1.6	4.2	1.5	1.8	2.7	1.5	5.4	3	2.9	2.1	1.6
	T1	2.9	5.4	1.6	1.9	1.6	1.1	4	4.3	4.9	1.4	1.2	3.9	2.9	4	3.8	2.5	1.2	1.2
	T6	1.7	1.2	0.8	1.1	1	0.7	1.1	1.5	1.9	0.8	0.7	1	0.9	1.4	0.8	0.5	1.3	0.8
	T12	-	0.8	1.2	0.8	1	0.8	0.8	2.3	1.9	1.3	0.9	0.6	1.3	1.7	1.4	1.3	1.1	-
Triglicéridos (mg/dL)	T0	53	64.3	56.5	86.2	41.6	53.5	70.4	28.3	75.7	54.4	79.1	51	68.7	57.6	107.7	130.1	50.6	59.1
	T1	65.7	67.4	88	83.7	69	41.4	85.2	146	59.5	89.2	63.1	53.2	99.5	82.8	100.1	61.4	83.3	53.8
	T6	110.9	60.7	52.5	178.3	67.3	59	81.7	79.5	87	76.1	61	57.5	57.6	100.8	71.9	80.3	82.4	52.7

	T12	-	127.3	62.5	97.5	54	65.4	54.7	90	196.4	96.9	58.2	44.7	100.2	110.5	82.9	91.3	61.1	-
Fósforo (mg/dL)	T0	4.15	4.09	2.51	4.48	3.31	1.14	4.67	4.97	4.79	3.73	5.26	4.84	2.26	2.06	4.59	3.84	3.62	5.41
	T1	3.31	4.74	2.65	4.78	4.07	3.47	4.67	3.86	5.31	5.34	4.77	3.34	3.06	2.69	4.04	3.54	2.55	4.35
	T6	4.7	4.51	1.65	3.15	2.9	1.46	2.88	2.47	4.08	2.37	3.2	3.61	2.82	2.26	2.82	2.62	2.13	4.04
	T12	-	4.3	2.22	2.58	3.42	2.07	3.58	2.85	4.55	2.02	3.51	3.41	2.93	2.64	4.6	2.35	2.43	-
Magnésio (mg/dL)	T0	1.49	2	2.3	1.93	1.63	2.38	1.6	1.79	1.72	1.6	1.6	1.53	1.5	1.62	1.56	1.5	1.59	1.54
	T1	1.62	2.31	2.13	1.99	1.83	2.56	1.51	2.11	1.69	1.88	1.84	1.8	1.88	1.86	2.16	1.73	1.81	1.43
	T6	1.7	2.05	1.76	2.15	1.41	2.67	1.6	1.78	1.98	2.03	1.6	1.75	1.7	2.07	2.16	1.92	1.77	1.69
	T12	-	2.2	2.43	2.21	2.08	2.44	1.59	1.82	1.7	1.98	1.69	1.71	1.74	2.13	2.05	2.04	1.78	-
Cálcio (mg/dL)	T0	16.94	15.06	15.97	15.59	16.04	15.63	15.55	15.33	16.98	17.79	14.83	15.44	17.72	16.63	14.58	16.06	15.95	17.61
	T1	15.31	15.74	14.65	14.79	15.93	13.8	15.88	14.82	15.73	15.29	15.07	14.96	16.36	14.72	15.18	15.59	14.71	15.22
	T6	11.89	16.31	14.31	16.16	5.62	13.9	15.1	16.13	16.91	17.87	14.84	16.81	15.68	16.63	14.8	15.2	16.26	13.45
	T12	-	13.29	15.12	10.8	16.19	14.66	15.16	15.96	10.43	16.2	15.4	14.9	14.9	16.19	14.67	15.07	14.8	-
Potássio (mmol/L)	T0	15.4	13.05	15.04	12.09	12.81	15.27	13.65	15.95	14.96	11.49	13.57	14.69	11.47	14.08	15.77	12.57	13.92	15.89
	T1	15.77	13.88	14.34	13.22	15.47	13.83	14.2	15.16	15.89	15.43	15.29	16.35	13.69	13.07	12.22	15.63	12.83	14.72
	T6	12.3	14.41	12.38	14.17	17.95	13.19	12.86	14.39	13.4	11.46	13.59	14.71	13.25	14.91	14.21	13.76	13.3	14.46
	T12	-	15.91	10.27	14.2	15.7	12.24	14.7	14.41	13.25	13.1	14.2	16.06	14.7	9.91	14.67	14.58	15.33	-
LDL (mg/dL)	T0	56.1	87.3	71.2	50.5	110.3	54	77.1	23.7	45.7	94.1	53.3	23.3	100	48.7	118.6	66.4	126.4	112.8
	T1	87.1	136.6	187.3	96	119.3	53.3	74.7	30.2	95.6	99.8	67.5	12.9	67.5	92.3	75.4	88.6	14.3	120.5
	T6	40.5	164.4	38.9	126.4	80.9	36.5	72.9	101	129.2	39.1	37.3	7.7	113.4	104.9	83.8	76.7	64	42.7
	T12	-	97	100.6	167.5	150.5	59.2	61	13.6	88.9	64.9	70.2	40.4	83.2	98.3	51.2	50	90.8	-
Proteína C Reativa (mg/dL)	T0	0.38	0.54	0.13	0.04	0.16	0.13	2.41	0.56	0.16	0.7	0.19	0.59	0.29	0.17	0.6	0.22	0.2	0.32
	T1	0.11	0	0.09	0.15	0.14	0.14	0.05	0.71	0.29	0.41	1.67	0.36	0.55	0	3.78	0.24	0.36	1.44
	T6	0.21	0	0.34	0.06	0.5	0.19	0.14	0.14	0	0.04	0.29	0.28	0.01	0.19	0.19	0.22	0.2	0.21
	T12	-	0.24	0.51	0.17	0.21	0.16	0.34	0.54	0.32	0.07	0.26	0.31	0.28	0.16	0.24	0.17	0.15	-
B2 Microglobulina (mg/L)	T0	0.3	0.2	0.5	0.2	0.6	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.4	0.2	0.1	0.3	0.4	0.2	0.3	0.1
	T1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1
	T6	0.2	0.1	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0	0.1	0.2	0.2	0.1	0	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1
	T12	-	0.4	0.3	0.1	0.3	0.3	0.2	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
TBARS (nmol/mL)	T0	12.06	5.58	8.82	6.58	5.58	6.33	9.32	2.59	9.32	6.33	6.58	7.33	4.83	7.82	5.58	6.08	5.58	3.84

	T1	7.58	7.58	6.08	6.58	6.83	6.58	3.59	2.34	3.84	14.8	5.08	5.58	5.33	3.09	4.34	3.09	2.09	2.34
	T6	3.59	4.34	3.84	4.09	4.83	2.84	4.34	4.59	5.58	3.09	4.34	3.84	4.83	5.83	4.09	2.84	2.84	4.09
	T12	-	4.34	4.34	1.59	1.35	1.35	4.09	2.84	3.59	1.35	3.34	3.34	4.34	4.83	2.09	1.35	0.6	-
DNPH (nmol/mL)	T0	20.68	25.82	25.55	15.64	12.23	13.27	12.36	15.82	23.77	8.68	21.68	35	12.91	24.73	11.41	28	23.64	11
	T1	9.64	15.36	10.14	11.77	10.27	12.68	8.73	16.23	10.82	9.05	11.5	14.41	8.91	17.05	7.68	8.41	8.95	7.59
	T6	26.18	24.09	17.41	2.23	2.14	2.18	20.59	25.36	13.09	11.45	19	17.95	20.55	11.91	18.09	9.91	2	2.23
	T12	-	2.23	1.95	17.73	8.32	15.68	5.41	2.5	2.27	2.09	2.55	3.73	6.59	8.5	8.73	14.18	11.91	-
GSH (µg/mL)	T0	0.76	2.57	1.86	0.67	2.07	0.83	0.64	1.51	0.39	0.37	0.72	0.03	0	1.32	0.85	1.17	0.47	0.95
	T1	1.11	1.75	0.87	2.12	0.43	0.98	0.8	0.41	2.06	0.18	2.79	3	1.49	0.4	4.09	1.08	2.79	5.86
	T6	2.9	4.25	5.34	3.66	3.64	1.19	3.05	7.26	0.45	0.58	2.91	2.34	4.48	4.63	1.63	11.33	2.44	0.36
	T12	-	77.14	1.18	0.62	0	87.57	53.81	0.1	0.09	1.36	1.2	4.04	1.23	0.89	0	0	1.16	-
UPC	T0	0.1	0.4	0.8	0.3	0.1	0.03	-	0.7	0.4	0.7	0.1	-	0.1	0.8	0.7	0.1	1.1	0.8
	T1	1.11	1.75	0.87	2.12	0.43	0.98	0.8	0.41	2.06	0.18	2.79	3	1.49	0.4	4.09	1.08	2.79	5.86
	T6	1	1.27	0.08	0.9	0.08	0.1	0.06	0.12	0.1	0.03	0.04	0.32	0.08	0.5	0.6	0.05	0.9	0.1
	T12	-	1	0.05	0.7	0.18	0.06	0.12	0.3	0.7	0.3	0.1	0.4	0.3	0.8	0.11	0.05	0.6	-

†Carga parasitária de *Leishmania infantum* na medula óssea. Tempos T0 = antes do tratamento; T1 = após ALD (G1 = dia 90; G2 = dia 60); T6 = seis meses após T0; T12 = 12 meses após T0. Valores de referência: Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ): 5,5-8,5; Hemoglobina (g/dL): 12-18; Hematócrito (%): 37-55; Plaquetas ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ): 166-575; Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ): 6-17; Linfócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ): 1-4,8; Albumina (g/dL): 2,6-3,3; Globulinas (g/dL): 2,7-4,4; Razão A/G: 0,5-1,7; Proteínas totais (g/dL): 5,4-7,1; gama glutamil transferase (GGT) (U/L): 1,2-6,4; alanina aminotransferase (ALT) (UI/L): 21-102; FA (U/L): 20-156; Creatinina (mg/dL): 0,5-1,5; Ureia (mg/dL): 15-40; HDL (mg/dL): 33-120; Ácido úrico (mg/dL): 0-2; Triglicerídeos (mg/dL): 20-112; Fósforo (mg/dL): 2,5-6,8; Magnésio (mg/dL): 1,8-2,4; Cálcio (mg/dL): 3-19,3; Potássio (mmol/L): 4,37-5,35; LDL (mg/dL): 43-179,7; Proteína C reativa (RPC) (mg/dL): 0-1; Microglobulina B2 (mg/L); substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (nmol/mL): 2,34-3,56; DNPH-carbonilas (nmol/mL); Glutaciona ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 1,71-2,43; relação proteína na urina: creatinina (UPC): <0,5 (Kaneko. 2008; Onishi et al., 2000; Macotpet et al., 2013; Groth et al., 2020. IRIS).

#### 4. Discussão

A busca por novos protocolos terapêuticos é crucial para ampliar as opções de manejo da infecção zoonótica por *L. infantum*, uma vez que os cães são suscetíveis ao desenvolvimento de LCan grave. Como a infecção por protozoários do gênero *Leishmania* gera estresse oxidativo às células hospedeiras (Almeida et al., 2013), o restabelecimento do equilíbrio redox através da administração de adjuvantes nutricionais (NAs) poderia ser um objetivo terapêutico para gerenciamento da LCan.

Os grupos diferiram no início dos NAs no protocolo terapêutico: os cães do G1 começaram a recebê-los mais cedo, 30 dias antes dos medicamentos anti-*Leishmania*, enquanto os cães do G2 iniciaram os NAs mais tarde, 20 dias após o término do tratamento com ALDs. Ao final do estudo, ambos os grupos exibiram melhora semelhante nas cargas parasitárias e no estadiamento clínico, indicando sucesso terapêutico comparável. No entanto, os dados do grupo que utilizou NAs precocemente demonstraram melhora clínica e nos biomarcadores de inflamação antes do outro grupo.

Notavelmente, cães que estavam recebendo apenas NAs no 30º dia de avaliação, portanto, antes mesmo de iniciar o tratamento com drogas anti-*Leishmania*, já apresentavam melhora clínica substancial em relação ao T0 (Fig. 2A-G). Atribuímos a falta de diferença estatística nos índices de melhora entre os grupos à considerável dispersão dos valores dentro de cada grupo, o que refletiu um grau de heterogeneidade individual, e em relação ao baixo número de cães remanescentes nos grupos ao final do estudo. Em um relatório anterior, mostramos dois perfis distintos de cães ao final do acompanhamento de 12 meses, que classificamos como respondedores e não respondedores de acordo com a carga parasitária resultante de *L. infantum*, independente do tratamento recebido (Gonçalves et al., 2020). No presente relatório, nosso objetivo foi observar a extensão das diferenças ao longo do tempo de administração de NAs, e dentro de ambos os grupos do presente estudo houve respondedores e não respondedores, o que tornou os grupos comparáveis.

A literatura é rica em estudos que mostram que fatores individuais, tanto genéticos como epigenéticos, estão intrinsecamente envolvidos na resposta ao tratamento da leishmaniose (Vanaerschot et al., 2014; Carnielli et al., 2018; Afrin et al., 2019). Observamos maior frequência de cães apresentando melhora clínica e parasitológica dentro do grupo que recebeu NAs precocemente.

A adição precoce de NAs no tratamento medicamentoso anti-*Leishmania* resultou em uma diminuição mais precoce da inflamação, expressa por níveis séricos mais baixos de globulinas totais, imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania* e proteína C reativa. Os compostos PUFA ômega-3 podem inibir vários mecanismos inflamatórios, como quimiotaxia de leucócitos e produção de citocinas pró-inflamatórias (Calder, 2017). Estudos têm demonstrado os benefícios do uso oral de PUFA ômega-3 em patologias caninas, como osteoartrite (Barrouin-Melo et al., 2016), patologia renal (Brown et al., 1998), patologia cardíaca (Smith et al., 2007) e em distúrbios comportamentais (Rahimi Niyyat et al., 2018). Recentemente, alguns autores investigaram e descreveram os benefícios do uso de NAs na terapia com LCan (Lombardi et al., 2019; Mastellone et al., 2020). Possivelmente, o consumo de PUFA ômega-3 no G1 nesse intervalo resultou em maior oferta de ácidos graxos insaturados e, portanto, maior disponibilidade de substratos para peroxidação lipídica e, portanto, maior TBARS.

Outros autores listaram a peroxidação lipídica entre os potenciais efeitos adversos da suplementação de cães com PUFA ômega-3 de óleo de peixe, enfatizando que EPA e DHA podem se depositar nas membranas celulares do corpo e sofrer peroxidação lipídica por radicais hidroxila (Burton e Jauniaux, 2011; Lenox e Bauer, 2013). Porém, no presente estudo, não podemos considerar a persistência de TBARS elevados observados no grupo que consumia PUFA ômega-3 (G1) como um efeito adverso deste, uma vez que os biomarcadores de inflamação e função renal acompanharam uma recuperação clínica substancial nesses cães. A cicatrização retardada do epitélio também foi listada entre os potenciais efeitos nocivos da suplementação de PUFA ômega-3 (Lenox e Bauer, 2013). Entretanto, enfatizamos que embora a maioria dos cães de ambos os grupos apresentasse abundância de lesões dermatológicas em T0, nenhuma deficiência de cicatrização foi observada especificamente para este sinal clínico de LCan em T1 ou outros tempos de monitoramento no presente estudo. De fato, a melhoria da pele esteve entre os primeiros sinais observados de recuperação da saúde em ambos os grupos e não foi diferente nos primeiros recebedores de PUFA ômega-3, mesmo na primeira avaliação pós-tratamento (T1), quando o outro grupo ainda não tinha recebido NAs.

Além disso, administramos PUFA ômega-3 em concentrações por peso, equivalentes a 1.000 mg/kg. Isto está abaixo do limite superior de administração segura para cães, determinado como 2.080 mg/kg de acordo com estudos de nutrição animal (Lenox e Bauer, 2013). Na medicina veterinária, vários suplementos nutricionais ainda são administrados empiricamente na clínica médica, sem dados científicos que sustentem as doses precisas recomendadas para cada patologia (Brown et al., 1998; Smith et al., 2007; Rahimi Niyyat et al., 1998; Smith et al.,

2007; Rahimi Niyyat et al., 2018; Westgarth et al., 2018).

A diminuição observada nos marcadores de oxidação lipídica em ambos os grupos ao final do estudo pode ser atribuída ao controle geral da inflamação resultante da administração de PUFA ômega-3, como visto no G1 em T1. Estudos anteriores mostraram que nutrientes antioxidantes têm um efeito protetor nas membranas celulares, resultando em menos morte celular tecidual e menos inflamação, atribuível aos processos homeostáticos que removem detritos em doenças inflamatórias (Suphioğlu et al., 2010; Bauer, 2011). Assim, podemos levantar a hipótese de que, no presente estudo, tanto o uso de PUFA ômega-3 quanto o complexo de vitamina B podem ter ajudado a controlar a oxidação devido ao dano tecidual e, ao mesmo tempo, minimizar a inflamação, como visto em alguns parâmetros no G1 em T1 e em ambos os grupos em T1, T6 e T12. As vitaminas do complexo B são um grupo de oito vitaminas essenciais solúveis em água que funcionam como coenzimas em diversas reações enzimáticas essenciais à homeostase redox, como o ciclo do ácido cítrico, o ciclo redox da glutatona redutase ou a síntese da hemoglobina (Kennedy, 2016; Barrouin-Melo et al., 2018).

O alopurinol tem sido descrito como um fármaco com atividade leishmaniosstática (Ginel et al., 1998), mas também possui propriedades antioxidantes, removendo radicais hidroxila (Buonocore e Groenendaal, 2007). Na avaliação feita após o término do curso de ALDs metronidazol/cetoconazol, e durante os 20 dias iniciais da administração de alopurinol (T1), apenas os cães que receberam NAs precoces (G1) apresentaram níveis séricos reduzidos de marcadores de inflamação. No entanto, tanto o TBARS como o DNPH diminuíram ao longo do tempo até ao final do estudo (T6 e T12). Os efeitos antioxidantes do alopurinol podem ter contribuído, em algum grau, para a melhoria da inflamação e para os resultados do equilíbrio redox. Como inibidor da xantina oxidase (Klein et al., 1996), o alopurinol possui atividade antioxidante com efeitos clínicos benéficos, conforme demonstrado anteriormente (Rachmat et al., 2013). Outro efeito terapêutico positivo do alopurinol observado no presente estudo foi no nível sérico de ácido úrico. Os cães de ambos os grupos exibiram níveis elevados de concentração sérica de ácido úrico antes do tratamento e um declínio nestes valores para dentro do intervalo de referência 6 e 12 meses após o tratamento. Elevações nas concentrações séricas de ácido úrico podem ocorrer em cães devido à disfunção renal (Thrall et al., 2014). Ao inibir a xantina oxidase, uma enzima que cliva a purina em ácido úrico (Graham et al., 1996), os efeitos terapêuticos do alopurinol na LCan incluíram proteção renal como visto no presente estudo. Além disso, a hipomagnesemia e a hiperfosfatemia observadas antes do tratamento

tenderam a retornar aos valores de referência à medida que o tratamento progrediu, bem como a proteinúria, um importante marcador da gravidade da LCan (Solano-Gallego et al., 2011; Meléndez-Lazo et al., 2018). A microglobulina beta-2, um biomarcador proteico de lesão tubular renal em pacientes humanos com leishmaniose visceral (Vitale et al., 1994), não foi previamente estudada em soros de cães com LCan.

Até onde sabemos, nenhum estudo sobre adjuvantes nutricionais no tratamento de cães com infecções crônicas naturais como a LCan relatou tal impacto nas lipoproteínas. Em humanos, foi relatado que o uso clínico de PUFA ômega-3 sob diferentes condições pode aumentar o HDL e o LDL no sangue, ao mesmo tempo que reduz os triglicerídeos (Harris, 1996; Paranandi et al., 2014; Oscarsson e Hurt-Camejo, 2017; Ide et al., 2014; Oscarsson e Hurt-Camejo, 2017; Ide et al., 2014; Oscarsson e Hurt-Camejo, 2017; Ide et al., 2014; Oscarsson e Hurt-Camejo, 2017; Ide et al., 2018). No entanto, no contexto dos presentes resultados, devemos considerar que um HDL sérico mais elevado pode ter ajudado na redução de biomarcadores inflamatórios. Mecanismos pelos quais o HDL pode modular a inflamação foram propostos na literatura (Ben-Aicha et al., 2020). De acordo com a literatura, o aumento da GGT plasmática em cães está associado à colestase, particularmente concomitante com alterações em outros biomarcadores de disfunção hepática – ALP, ALT, ureia, albumina, colesterol ou triglicerídeos (Whitfield, 2001; Thrall et al., 2014). Assumimos esse aumento transitório de GGT como um mecanismo compensatório para o fornecimento precoce de PUFA ômega-3, elevando assim a disponibilidade de substratos lipídicos para oxidação, o que pode ter aumentado a demanda pela síntese de glutatona. Na verdade, a GGT atua como um catalisador para a transferência de grupos glutamyl para manter os níveis intracelulares de glutatona (Whitfield, 2001). Nesse sentido, a GGT em altas concentrações é um marcador preditivo precoce de aterosclerose e doenças cardíacas em humanos (Mason et al., 2010; Bradley et al., 2014; Koenig e Seneff, 2015). No entanto, tais papéis metabólicos da GGT não são tão claros na espécie canina e devem ser mais estudados.

O presente estudo teve pontos fortes e limitações. O número de amostras de cães que receberam acompanhamento até o final do estudo foi pequeno, provavelmente porque o estudo foi relativamente longo. O presente estudo teria se beneficiado de um número muito maior de casos. No entanto, nossos dados indicam que um desequilíbrio redox parece ser um aspecto relevante na fisiopatologia da LCan, uma vez que os efeitos positivos do protocolo de tratamento que incluiu NAs foram observados em múltiplos parâmetros clínicos relevantes.

Num estudo maior, valeria a pena esclarecer até que ponto os NAs ou o alopurinol ou a combinação destas substâncias e medicamentos podem impactar o equilíbrio redox e o controle da inflamação em pacientes caninos com LCan.

## 5. Conclusões

Nossos dados demonstram que o uso de adjuvantes nutricionais ajudou a regular a inflamação, conforme demonstrado pela diminuição das globulinas totais, das imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania* e do aumento da relação albumina/globulina sérica em cães tratados para LCan. O tratamento com drogas anti-*Leishmania* associadas a PUFA ômega-3 e vitaminas B precocemente também melhorou alterações clínicas mediante normalização da função renal e peroxidação lipídica e proteica. Este estudo levantou múltiplas questões a serem exploradas em estudos com populações caninas maiores que buscam compreender melhor o impacto dos adjuvantes nutricionais na terapia com LCan, como os efeitos dos adjuvantes nutricionais sobre HDL, LDL, triglicérides, GGT e marcadores de estresse oxidativo.

## Referências

- AFRIN, F., KHAN, I. E HEMEG., H. A. " *Leishmania*-Host Interactions - An Epigenetic Paradigm." *Front Immunology*, v. 10, 2019.
- ALMEIDA, B. F. M.; NARCISO, L. G.; MELO, L. M.; PREVE, P. P.; BOSCO, A. M.; LIMA, V. M. F.; CIARLINI, P. C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 599–605, 2013.
- ALVES, C. F.; DE AMORIM, I. F. G.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; MELO, M. N. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349–58, 15 abr. 2009.
- ANGIULLI, G.; LANTELLA, A.; FORTE, E.; ANGELUCCI, F.; COLOTTI, G.; ILARI, A.; MALATESTA, F. *Leishmania infantum* trypanothione reductase is a promiscuous enzyme carrying an NADPH: O<sub>2</sub> oxidoreductase activity shared by glutathione reductase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, n. 9, p. 1891–1897, 2015.
- BACKES, J.; ANZALONE, D.; HILLEMANN, D.; CATINI, J. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. **Lipids in Health and**

**Disease**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2016.

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

BARBOSA, J.; FARIA, J.; LEAL, S.; AFONSO, L. P.; LOBO, J.; QUEIRÓS, O.; MOREIRA, R.; CARVALHO, F.; DINIS-OLIVEIRA, R. J. Acute administration of tramadol and tapentadol at effective analgesic and maximum tolerated doses causes hepato- and nephrotoxic effects in Wistar rats. **Toxicology**, v. 389, p. 118–129, 2017.

BARBOSA, K.; COSTA, N.; ALFENAS, R. DE C.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARROUIN-MELO, S. M.; ANTURANIEMI, J.; SANKARI, S.; GRIINARI, M.; ATROSHI, F.; OUNJAJEAN, S.; HIELM-BJÖRKMAN, A. K. Evaluating oxidative stress, serological- and haematological status of dogs suffering from osteoarthritis, after supplementing their diet with fish or corn oil. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2016.

BARROUIN-MELO, S. M.; MOREJÓN TERÁN, Y. A.; ANTURANIEMI, J.; HIELM-BJÖRKMAN, A. K. Interaction Between Nutrition and Metabolism. In: SILVESTRE, RICARDO, TORRADO, E. (Ed.). **Metabolic Interaction in Infection**. [s.l.] Springer, 2018. p. 29–114.

BAUER, J. E. Timely Topics in Nutrition Therapeutic use of fish oils. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 239, n. 11, p. 1441–1451, 2011.

BEN-AICHA, S.; BADIMON, L.; VILAHUR, G. Advances in HDL: Much more than lipid transporters. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1–18, 2020.

BILDIK, A. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. v. 77, p. 63–66, 2004.

BRADLEY, R.; FITZPATRICK, A.; JACOBS JR, D.; LEE, D.-H.; JENNY, N.; WAKE, D. H. Associations between  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) and Biomarkers of Atherosclerosis: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **Atherosclerosis**, n. 673–702, p. 771–792, 2014.

BRASIL. **Guia de Orientação para Vigilância de Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**. Disponível em:

[http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia\\_Basico\\_de\\_Orientacao\\_LVC\\_2018.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia_Basico_de_Orientacao_LVC_2018.pdf). 2015. Acesso em: 14 out. 2020.

BRAZ-DE-MELO, H. A.; PASQUARELLI-DO-NASCIMENTO, G.; CORRÊA, R.; DAS NEVES ALMEIDA, R.; DE OLIVEIRA SANTOS, I.; PRADO, P. S.; PICCOLO, V.; DE BEM, A. F.; PIZATO, N.; MAGALHÃES, K. G. Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

BROWN, S. A.; BROWN, C. A.; CROWELL, W. A.; BARSANTI, J. A.; ALLEN, T.; COWELL, C.; FINCO, D. R. Beneficial effects of chronic administration of dietary  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in dogs with renal insufficiency. **Journal of Laboratory and**

**Clinical Medicine**, v. 131, n. 5, p. 447–455, 1998.

BUONOCORE, G.; GROENENDAAL, F. Anti-oxidant strategies. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 12, n. 4, p. 287–295, 2007.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–299, 2011.

BUTLER, C.C., VIDAL-ALABALL, J., CANNINGS-JOHN, R., MCCADDON, A., HOOD, K., PAPAIOANNOU, A., MCDOWELL, I., GORINGE, A. Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency: a systematic review of randomized controlled trials, **Family Practice**, v. 23, 3, 2006.

CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 5, p. 1105–1115, 2017.

Carnielli, J. B.T., Crouch, K., Forrester, S., Silva, V. C., Carvalho, S. F. G., Damasceno, J. D., Brown, E., Dickens, N.J., Costa, D. L., Costa, C H.N. Dietze, R., Jeffares, D. C., Mottram, J. C. A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis, **EBioMedicine**, v 36, 2018.

CORTESE, L.; ANNUNZIATELLA, M.; PALATUCCI, A. T.; LANZILLI, S.; RUBINO, V.; DI CERBO, A.; CENTENARO, S.; GUIDETTI, G.; CANELLO, S.; TERRAZZANO, G. An immune-modulating diet increases the regulatory T cells and reduces T helper 1 inflammatory response in Leishmaniosis affected dogs treated with standard therapy. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2015.

DA COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MARQUES MICHALICK, M. S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636–643, 2007.

DEFILIPPIS, A. P.; SPERLING, L. S. Understanding omega-3's. **American Heart Journal**, v. 151, n. 3, p. 564–570, 2006.

DIMRI, U.; RANJAN, R.; KUMAR, N.; SHARMA, M. C. Changes in oxidative stress indices , zinc and copper concentrations in blood in canine demodicosis. v. 154, p. 98–102, 2008.

FREITAS, RDS., CAMPOS, M.M. Protective effects of omega-3 fatty acids in cancer related complications. **Nutrients**, v. 11, 2019.

GINEL, P.J., LUCENA, R., MOLLEDA, M. Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 39, 1998.

GONÇALVES, R. D. S.; DE PINHO, F. A.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; AZEVEDO, R.; GAIFEM, J.; LARANGEIRA, D. F.; RAMOS-SANCHEZ, E. M.; GOTO, H.; SILVESTRE, R.; BARROUIN-MELO, S. M. Mathematical modelling using predictive biomarkers for the outcome of canine leishmaniasis upon chemotherapy. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 1–15, 2020.

GRAHAM, S., DAY, R. O., WONG, H., McLACHLAN, A.J., BERGENDAL, L., MINERS, J.O., BIRKETT, D.J. Pharmacodynamics of oxypurinol after administration of allopurinol to

healthy subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, 1996.

GROTH, E. M., CHEW, D. J., LULICH, J.P., TOMMET, M., RENDAHL, A. K., HUSBANDS, B.D., FURROW, E. Determination of a serum total calcium concentration threshold for accurate prediction of ionized hypercalcemia in dogs with and without hyperphosphatemia. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 34, 2020.

HARRIS, W. S. n-3 fatty acids and lipoproteins: Comparison of results from human and animal studies. **Lipids**, v. 31. 1996.

HEIDARPOUR, M.; SOLTANI, S.; MOHRI, M.; KHOSHNEGAH, J. Canine visceral leishmaniasis : relationships between oxidative stress , liver and kidney variables , trace elements , and clinical status. p. 1491–1496, 2012.

IDE, K., KOSHIZAKA, M., TOKUYAMA, H., TOKUYAMA, T., ISHIKAWA, T., MAEZAWA, Y., TAKEMOTO, M., & YOKOTE, K. N-3 polyunsaturated fatty acids improve lipoprotein particle size and concentration in Japanese patients with type 2 diabetes and hypertriglyceridemia: a pilot study. **Lipids in health and disease**, v. 17, 51, 2018.

IKEDA-GARCIA, F. A., LOPES, R. S., MARQUES, F. J., LIMA, V. M. F., MORINISHI, C. K., BONELLO, F. L., ZANETTE, M. F., PERRI, S. H. V., FEITOSA, M.M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate, **Veterinary Parasitology**, v 143, 3–4, 2007.

KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. [s.l.] Academic Press, 2008.

KENNEDY, D. O. B vitamins and the brain: Mechanisms, dose and efficacy—A review. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 1–29, 2016.

KLEIN, A. S., WON JOH, J., RANGAN, U., WANG, D., BULKLEY, G. B., Allopurinol: Discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities, **Free Radical Biology and Medicine**, v 21, 5, 1996.

KOENIG, G.; SENEFF, S. Gamma-Glutamyltransferase: A Predictive Biomarker of Cellular Antioxidant Inadequacy and Disease Risk. **Disease Markers**, v. 2015, p. 1–18, 2015.

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G. VAN; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes ? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.

LENOX, C. E.; BAUER, J. E. Potential adverse effects of omega-3 fatty acids in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 2, p. 217–226, 2013.

LOMBARDI, P.; PALATUCCI, A. T.; GIOVAZZINO, A.; MASTELLONE, V.; RUGGIERO, G.; RUBINO, V.; MUSCO, N.; CRUPI, R.; CUTRIGNELLI, M. I.; BRITTI, D.; VASSALOTTI, G.; TERRAZZANO, G.; CORTESE, L. Clinical and immunological response in dogs naturally infected by *L. infantum* treated with a nutritional supplement. **Animals**, v. 9, n. 8, p. 1–14, 2019.

MACOTPET, A., SUKSAWAT, F., SUKON, P., PIMPAKDEE, K., PATTARAPANWICHEN, E., TANGRASSAMEEPRASERT, R., BOONSIRI, P. Oxidative stress in cancer-bearing dogs assessed by measuring serum malondialdehyde. **BMC**

**Veterinary Research**, v. 9, 1-6, 2013.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V. F.; MICHELE, P. L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A. E. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3–4, p. 271–280, 2006.

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

MARTINS, M. J.; ROQUE BRAVO, R.; ENEA, M.; CARMO, H.; CARVALHO, F.; BASTOS, M. DE L.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; DIAS DA SILVA, D. Ethanol addictively enhances the in vitro cardiotoxicity of cocaine through oxidative damage, energetic deregulation, and apoptosis. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 7, p. 2311–2325, 2018.

MASON, J. E.; STARKE, R. D.; VAN KIRK, J. E. Gamma-glutamyl transferase: A novel cardiovascular risk biomarker. **Preventive Cardiology**, v. 13, n. 1, p. 36–41, 2010.

MASTELLONE, V.; MUSCO, N.; VASSALOTTI, G.; PIANTEDOSI, D.; VASTOLO, A.; CUTRIGNELLI, M. I.; BRITTI, D.; CORTESE, L.; LOMBARDI, P. A nutritional supplement (Dilsh™) improves the inflammatory cytokines response, oxidative stress markers and clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Animals**, v. 10, n. 6, 2020.

MELÉNDEZ-LAZO, A.; ORDEIX, L.; PLANELLAS, M.; PASTOR, J.; SOLANO-GALLEGO, L. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. **Research in Veterinary Science**, v. 117, p. 18–27, 2018.

MIKKELSEN, K.; APOSTOLOPOULOS, V. B Vitamins and ageing. **Subcellular Biochemistry**, v. 90, p. 451–470, 2018.

ONISHI, T., INOKUMA, H., OHNO, K., SOEDA, S., NOGUCHI, K. SASAKI, K. C-reactive Protein Concentrations in Normal and Diseased Dogs-Measured by Laser Nephelometric Immunoassay, **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 53, 2000.

OSCARSSON, J.; HURT-CAMEJO, E. Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their mechanisms of action on apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans: A review. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2017.

PALTRINIERI, S. Oxidative stress and canine leishmaniasis : More than a simple consequence of host – parasite interaction. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 547–548, 2013.

PALTRINIERI, S.; RAVICINI, S.; ROSSI, G.; ROURA, X. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Journal**, v. 186, n. 3, p. 393–395, 2010.

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

- PARANANDI, A., ASZTALOS, B. F., MANGILI, A., KUVIN, J., GERRIOR, J., SHEEHAN, H., SKINNER, S. C., TANG, A. M., WANKE, C.A. Short Communication: Effects of Omega-3 Fatty Acids on Triglycerides and High-Density Lipoprotein Subprofiles in HIV-Infected Persons with Hypertriglyceridemia. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 30, 2014.
- PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BERNADINA, W., DEL REAL, G., RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 229–235, 1994.
- PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- RACHMAT, F. D., RACHMAT, J., SASTROASMORO, S., & WANANDI, S. I. Effect of allopurinol on oxidative stress and hypoxic adaptation response during surgical correction of tetralogy of fallot. **Acta medica Indonesiana**, v. 45, 2013.
- RAHIMI NIYYAT, M.; AZIZZADEH, M.; KHOSHNEGAH, J. Effect of Supplementation With Omega-3 Fatty Acids, Magnesium, and Zinc on Canine Behavioral Disorders: Results of a Pilot Study. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 33, n. 4, p. 150–155, 2018.
- ROLÃO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O. R.; CAMPINO, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by Real-Time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction – enzyme-linked immunosorbent assay real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction – enzyme-linked i. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 1150–1154, 2004.
- SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 438–463, 1991.
- SMITH, C. E.; FREEMAN, L. M.; RUSH, J. E.; CUNNINGHAM, S. M.; BOURGE, V. Omega-3 fatty acids in boxer dogs with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 2, p. 265–273, 2007.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G.; THE LEISHVET GROUP. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, jan. 2011.
- SOUZA, C. C.; BARRETO, T. D. O.; SILVA, S. M.; PINTO, A. W. J.; TAFURI, W. L.; FIGUEIREDO, M. M.; ROCHA, O. G. F.; CANGUSS, S. D. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. **Experimental Pathology**, v. 95, p. 260–270, 2014.
- SUPHIOGLU, C.; DE MEL, D.; KUMAR, L.; SADLI, N.; FREESTONE, D.; MICHALCZYK, A.; SINCLAIR, A.; ACKLAND, M. L. The omega-3 fatty acid, DHA, decreases neuronal cell death in association with altered zinc transport. **FEBS Letters**, v. 584, n. 3, p. 612–618, 2010.
- THOMAS, J.; THOMAS, C. J.; RADCLIFFE, J.; ITSIOPOULOS, C. Omega-3 Fatty Acids in Early Prevention of Inflammatory Neurodegenerative Disease: A Focus on Alzheimer's

Disease. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. [s.l.] Roca, 2014.

TORRECILHA, R. B. P.; UTSUNOMIYA, Y. T.; BOSCO, A. M.; ALMEIDA, B. F.; PEREIRA, P. P.; NARCISO, L. G.; PEREIRA, D. C. M.; BAPTISTIOLLI, L.; CALVO-BADO, L.; COURTENAY, O.; NUNES, C. M.; CIARLINI, P. C. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 132, p. 83–87, 2016.

VAN ASSCHE, T., DESCHACHT, M., LUZ, R. A. I., MAES, L., COS, P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology, *Free Radical Biology and Medicine*, v. 51, 2, 2011.

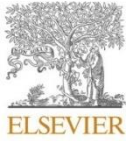
Vanaerschot, M., Dumetz, F., Roy, S., Ponte-Sucre, A. Arevalo, J., Dujardin, J.C. Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype?. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.12:8, 2014.

VITALE, G.; MOCCIARO, C.; GAMBINO, G.; SPINELLI, A.; GIORDANO, C.; STASSI, G. Evaluation of serum levels of soluble CD4, CD8 and B2-microglobulin in visceral human leishmaniasis. **Clinical and experimental Immunology**, v. 97, p. 280–283, 1994.

WESTGARTH, S.; BLOIS, S. L.; D. WOOD, R.; VERBRUGGHE, A.; MA, D. W. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids and aspirin, alone and combined, on canine platelet function. **Journal of Small Animal Practice**, v. 59, n. 5, p. 272–280, 2018.

WHITFIELD, J. B. Gamma glutamyl transferase. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 38, n. 4, p. 263–355, 2001.

ZANDI, P. P.; ANTHONY, J. C.; KHACHATURIAN, A. S.; STONE, S. V.; GUSTAFSON, D.; TSCHANZ, J. A. T.; NORTON, M. C.; WELSH-BOHMER, K. A.; BREITNER, J. C. S. Reduced Risk of Alzheimer Disease in Users of Antioxidant Vitamin Supplements: The Cache County Study. **Archives of Neurology**, v. 61, n. 1, p. 82–88, 2004.



## Research paper

## Nutritional adjuvants with antioxidant properties in the treatment of canine leishmaniasis

Rafaela de Sousa Gonçalves<sup>a,b</sup>, Flaviane Alves de Pinho<sup>a,c</sup>, Ricardo Jorge Dinis-Oliveira<sup>d,e,f</sup>, Mariana Oliveira Mendes<sup>a</sup>, Tiago Sena de Andrade<sup>a</sup>, Manuela da Silva Solcà<sup>g</sup>, Daniela Farias Larangeira<sup>a,c</sup>, Ricardo Silvestre<sup>b,h</sup>, Stella Maria Barrouin-Melo<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Veterinary Infectious Diseases, Teaching Hospital of Veterinary Medicine, Federal University of Bahia, 40170-110, Salvador, BA, Brazil

<sup>b</sup> Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine, University of Minho, 4710-057, Braga, Portugal

<sup>c</sup> Department of Veterinary Anatomy, Pathology and Clinics, School of Veterinary Medicine and Zootechny, Federal University of Bahia, 40170-110, Salvador, BA, Brazil

<sup>d</sup> TOXRUN – Toxicology Research Unit, Department of Sciences, University Institute of Health Sciences (IUCS), CESPU, CRL, Rua Central de Gandra, 1317, 4585-116, Gandra, Portugal

<sup>e</sup> Department of Public Health and Forensic Sciences, and Medical Education, Faculty of Medicine, University of Porto, 4200-319, Porto, Portugal

<sup>f</sup> UCIBIO-REQUIMTE, Laboratory of Toxicology, Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, 4050-313, Porto, Portugal

<sup>g</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Production of the School of Veterinary Medicine and Zootechny, UFBA, 40170-110, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>h</sup> ICVS/3B's Associate Laboratory, 4710-057, Braga, Portugal



## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Complex B  
*Leishmania infantum*  
Nutraceuticals  
Omega 3  
Vitamins

## ABSTRACT

Clinical improvement of dogs treated for canine leishmaniasis (CanL) requires reducing *Leishmania infantum* loads, which depend on intracellular oxidant compounds to destroy the parasite. However, oxidative species' excess and antioxidants consumption can culminate in oxidative stress, resulting in increased, widespread inflammation. We aimed to evaluate if early or late addition of nutritional adjuvants (NAs) – omega-3 polyunsaturated fatty acids and B vitamins – to anti-*Leishmania* drugs (ALDs) in the treatment of CanL would be clinically beneficial. For that, serum biomarkers including oxidative stress parameters were analyzed during 12 months in dogs allocated to two treatment groups: (G1) NAs administered from 30 days prior to the beginning of ALDs; and (G2) NAs administered from 61 days after the beginning of ALDs. Both G1 and G2 continued to receive NAs until the 12th month. The ALDs administered were metronidazole associated with ketoconazole (40 days), followed by allopurinol from day 41 until the 12th month. G1 exhibited superior inflammation control, with reduced globulins ( $p = 0.025$ ), specific anti-*Leishmania* immunoglobulins ( $p = 0.016$ ), total protein ( $p = 0.031$ ), and an increased serum albumin/globulin ratio ( $p = 0.033$ ), compared to G2. The early use of NAs associated with ALDs is clinically beneficial in treating dogs with CanL.

## 1. Introduction

Domestic dogs are susceptible to infection by *Leishmania infantum*, an intracellular protozoan which causes canine leishmaniasis (CanL), a serious chronic zoonotic infectious disease that requires treatment and monitoring (Solano-Gallego et al., 2011). *L. infantum* modulates the canine immune system, favoring an immune response predominantly orchestrated by T<sub>H</sub>2 lymphocytes (Pinelli et al., 1994). This response is characterized by excessive production of non-protective antibodies that cause systemic immune-mediated disease due to the deposition of

immune complexes in the host's organs (Manna et al., 2006; Baneth et al., 2008). Besides, high parasitic loads develop in the more susceptible dogs, producing direct tissue lesions, which associates with immune-mediated disease and culminates in the manifestation of several clinical signs and inflammatory clinical-pathological abnormalities (da Costa-Val et al., 2007; Alves et al., 2009; Torrecilha et al., 2016).

*Leishmania* can evade the immune system by inhibiting the oxidative burst and neutralizing oxidative species, such as superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl (HO·), peroxyxynitrite (ONOO-) or nitric oxide (NO) produced

\* Corresponding author at: Laboratório de Infectologia Veterinária, Hospital-Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros 500, Salvador, BA, CEP: 40170-110, Brazil.

E-mail address: [barrouin@ufba.br](mailto:barrouin@ufba.br) (S.M. Barrouin-Melo).

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109526>

Received 4 January 2021; Received in revised form 14 June 2021; Accepted 5 July 2021

Available online 8 July 2021

0304-4017/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

within macrophages' phagolysosomes, where these parasites manage to survive and multiply (Laskay et al., 2003; Van Assche et al., 2011; Angiulli et al., 2015). Reactive oxygen species are unstable molecules also produced during the host's metabolic processes and require a proportional production of antioxidant molecules to prevent tissue damage (Pizzino et al., 2017). The production of oxidative species increases during infectious or inflammatory diseases (Dimri et al., 2008). During chronic inflammation there is a redox imbalance characterized by oxidative stress, which results from the release of an excess of oxidants and the consumption of antioxidants molecules that neutralize them (Paltrinieri, 2013). Evidence of oxidative stress has been demonstrated in CanL, with a marked presence of oxidative species in the host (Bildik et al., 2004; Paltrinieri et al., 2010; Heidarpour et al., 2012; Almeida et al., 2013; Souza et al., 2014).

Meglumine antimoniate is considered the first-choice drug in the treatment of CanL in Europe, frequently concomitant with allopurinol (Solano-Gallego et al., 2011). However, relapses occur in a considerable proportion of treated dogs, particularly in the most susceptible (Ikeda-Garcia et al., 2007; Manna et al., 2015). In Brazil, antimonials are used to treat human visceral leishmaniasis, and their use in animals is prohibited with the justification of avoiding a possible selection of resistant parasites (Brasil, 2018). Thus, prospecting for drugs and alternative protocols is necessary for the treatment of CanL.

A number of studies have demonstrated the importance of immunonutrition in the treatment of human inflammatory diseases with diverse objectives including the reduction and prevention of tissue damage caused by oxidative stress (Simopoulos, 1991; Zandi et al., 2004; Barrouin-Melo et al., 2018). Given the metabolic impact of inflammatory and parasitic factors of CanL, the therapeutic potential of nutraceutical molecules, such as those in fish oil, krill oil, and dried mushrooms has been evaluated (Cortese et al., 2015; Lombardi et al., 2019; Mastellone et al., 2020). Among commonly used nutritional adjuvants with antioxidant properties, omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), defined as long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) mostly isolated from cold-water fish are extensively cited in the literature due to their anti-inflammatory and antioxidant properties (DeFilippis and Sperling, 2006; Backes et al., 2016; Braz-De-Melo et al., 2019). Omega-3 therapeutic effects have been demonstrated in studies of human and animal diseases (Brown et al., 1998; Thomas et al., 2015; Backes et al., 2016; Barrouin-Melo et al., 2016; Rahimi-Niyat et al., 2018; Freitas and Campos, 2019). B-complex vitamins compose a group of eight water-soluble vitamins that act as coenzymes in enzymatic reactions and have been shown to help to ameliorate diverse pathologies (Butler et al., 2006; Barrouin-Melo et al., 2018).

Clinical improvement of dogs undergoing treatment for CanL requires reducing the parasitic load, which depends on the action of intracellular oxidant compounds to destroy parasites, but also exposes the host to systemic oxidative stress. Thus, the objective of the present study was to investigate if the addition of nutritional adjuvants (omega-3 PUFA and B vitamins), administered either early or late in the course of second-choice anti-*Leishmania* drugs (metronidazole, ketoconazole, and allopurinol) in the treatment of CanL would help in promoting clinical improvement of the dogs, as expressed in a panel of serum biomarkers including oxidative stress parameters and clinical outcome.

## 2. Material and methods

### 2.1. Ethics, animals, and experimental design

The study was conducted in the Teaching Hospital of Veterinary Medicine of the Federal University of Bahia (UFBA), Brazil, and the subjects were owned dogs (Gonçalves et al., 2020). This study consisted of the clinical follow-up of a subset of dogs that received nutritional adjuvants at two different times during a long-term therapeutic intervention. All procedures involving dogs abided by bioethical principles of animal experimentation, following prior ethical approval by the

Committee of Ethics in the Use of Animals (Protocol CEUA-UFBA, n. 19/2011). Accordingly, the study followed the guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the Brazilian law on "Procedures for the Scientific Use of Animals" (n. 11,794/2008). All dog owners signed an informed consent form for their dogs to be included.

Eighteen dogs naturally infected by *L. infantum* and domiciled in an area endemic for zoonotic leishmaniasis underwent diagnosis, treatment, and monitoring from the beginning to the end of the 12-month study. The study inclusion criterion was *L. infantum* positive status, as detected by parasitological tests (bone marrow and/or lymph node cytology) and species-specific PCR. The exclusion criteria were occurrence of coinfections with other endemic pathogens, such as *Ehrlichia canis* or *Babesia canis*, and/or comorbidities, such as neoplasia, heart or endocrine diseases, before or during treatment and monitoring, terminal CanL, and non-adherence of dog owners to the treatment and monitoring rules. Clinical staging of CanL followed the LeishVet guidelines (Solano-Gallego et al., 2011). Dogs wore deltamethrin-based repellent collars throughout the study.

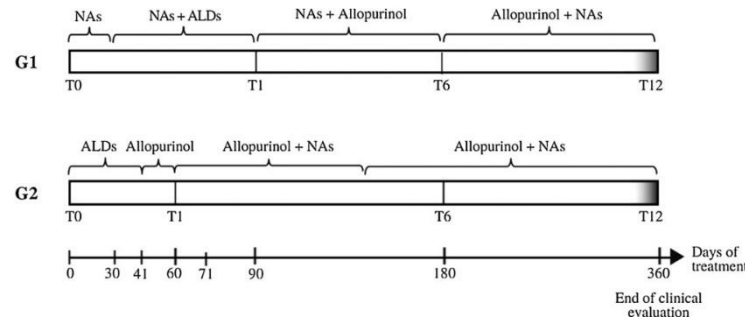
At the beginning of the study, following *L. infantum* confirmation and clinical staging, 30 dogs were randomly assigned into two groups, for early (G1) or late (G2) initiation of nutritional adjuvant (NA) administration in the therapeutic protocol (Fig. 1). Anti-*Leishmania* drugs (ALDs) used were metronidazole (25 mg/kg BID for 30 days) associated with ketoconazole (10 mg/kg SID for 40 days). The leishmaniostatic allopurinol was then administered (10 mg/kg BID from day 41 until the end of the study) as previously described (Gonçalves et al., 2020). The nutritional adjuvants (NAs) consisted of oral capsules of polyunsaturated fatty acids (omega 3 PUFA: eicosapentaenoic acid [EPA] and docosahexaenoic acid [DHA] [1,000 mg/kg SID]), and a commercial oral liquid formulation of B vitamins (2 drops/kg SID) (Supplementary Table 1). Early adjuvant G1 dogs received only NAs for 30 days before beginning anti-*Leishmania* drugs (ALDs starting on day 31); these adjuvants were administered without interruption until the end of the monitoring which occurred on the 12th month. Late adjuvant G2 dogs received only anti-*Leishmania* drugs (ALDs starting on day 0) for 40 days, and allopurinol was then administered alone for 20 days (from day 41 to day 61) before the beginning of NAs, which were added from day 61 until the end of the study. Therefore, dogs from the G2 group acted as the non-NAs control for the 61 days before NAs were administered. The G2 group thereby provided data to compare with their own from this time point (after NAs) until the 12th month (Fig. 1).

Data described in this study refer to the only dogs that could be followed from the beginning (T0) until the 12th month of monitoring (T12); six dogs remained in the G1 and 12 dogs in the G2 (Fig. 1). Dogs were removed because of death from other reasons (n = 3), acquisition of coinfections or comorbidities (n = 5), and treatment interruption by dog owner non-adherence (n = 4).

### 2.2. Biological samples

Approximately 10 mL of blood were collected from the dogs' jugular or cephalic vein and stored in tubes with EDTA (BD Vacutainer, Becton Dickinson) to obtain whole blood for quantification of hematological cells, and tubes without anticoagulant to obtain sera for biochemical and metabolic measurements of oxidative stress. Dogs from groups G1 and G2 were evaluated at four specific intervals: Time Zero (T0), immediately before treatment; Time 1 (T1), at the end of the course of treatment with ALDs plus 20 days of allopurinol; and Times T6 and T12, respectively, at the end of 6 and 12 months after T0. Therefore, the T1 of the G1 group corresponded to Day 90, while the T1 of the G2 group was on Day 60. At T6 and T12, all dogs in both groups were administered the same therapeutic protocol consisting of allopurinol, omega-3 PUFA, and B vitamins.

Urine aliquots were collected for analyses and quantification of urinary protein and creatinine (UPC). Bone marrow aspirates were



**Fig. 1.** Experimental design of the study on the treatment and follow-up during 12 months of dogs with naturally acquired canine leishmaniasis (CanL) caused by *Leishmania infantum* with early (G1) or late (G2) addition of nutritional adjuvants (NAs) omega-3 PUFA and B-complex vitamins in the course of protocols with anti-*Leishmania* drugs (ALDs) metronidazole and ketoconazole, followed by leishmaniostatic allopurinol.

performed to quantify the parasitic load of *L. infantum* at T0, T6, and T12, as described by Paparcone et al. (2013).

### 2.3. Parasitological diagnosis/parasitic load

The commercial kit PureLink Genomic DNA® (Invitrogen; USA) was used to extract bone marrow DNA from infected dogs at T0, T6, and T12, following the manufacturer's recommendations. The quality and concentration of DNA in each eluate were assessed using the L-QUANT spectrophotometer (Loccus; Sao Paulo, Brazil). Real-time PCR was performed following a previously described protocol (Rolão et al., 2004), with adaptations for the present research (Gonçalves et al., 2020).

### 2.4. Clinical examination for CanL clinical staging

The dogs were clinically evaluated for clinical signs compatible with CanL in every monitoring time. Signs observed during physical examination were analyzed in combination with pathology data to define the dogs' clinical stage. As standardized by the LeishVet group (Solano-Gallego et al., 2011), the disease has four clinical stages: mild (1), moderate (2), severe (3), and very severe (4). The definition of clinical staging depends essentially on the degree of renal impairment presented by the dogs. Proteinuric dogs (UPC > 1) are classified in stage 3, and azotemic (creatinine values > 2 mg/dL) and uremic, in stage 4.

### 2.5. Blood count, serum biochemistry, and serum oxidative stress biomarkers

The hemoglobin and hematocrit parameters were quantified in a specific hematological device for domestic animals, the poch-100iv (Diff). Cell morphology and presence of hematozoa were determined using blood smears. The reticulocyte count was also determined in blood smears stained with new methylene blue or cresyl blue. The following biochemical parameters were measured in the dogs' serum: proteins (total, albumin, C-reactive protein, beta-2 microglobulin [Cormay; Lomianki, Poland]), minerals (magnesium, phosphorus, calcium [Spinreact; Barcelona, Spain]), metabolites (urea, creatinine, uric acid [Spinreact]), lipids (lipoproteins from high [HDL] and low [LDL] densities and triglycerides [Cormay]), enzymes (gamma-glutamyl transferase [GGT] [Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brazil]), alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT) (Wiener Lab, Rosario, Argentina) using the semi-automatic biochemical analyzer (BioPlus-200) and the automatic analyzer (Prestige 24i) following manufacturers' recommendations. To quantify total globulins, the total serum protein values were subtracted from the albumin values, and their ratio (albumin/globulin - A/G) was determined. Perchloric acid was

added to the dogs' serum to precipitate proteins for the quantification of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and carbonyl groups (expressed as nanomoles/mL of DNPH), respectively, to evaluate lipid and protein peroxidation as described in the literature (Barbosa et al., 2017). The total glutathione, which corresponds to oxidized and reduced glutathione, was measured in serum via glutathione reductase activity, following previously described methods (Martins et al., 2018).

The reference values for serum biochemical parameters were provided by veterinary clinical pathology literature (Kaneko et al., 2008) or studies of large healthy canine populations (Onishi et al., 2000; Macotpet et al., 2013; Groth et al., 2020).

### 2.6. Urinary protein-creatinine ratio (UPC)

Creatinine (Wiener Lab; Rosario, Argentina) values were measured in diluted urine samples. Both protein and creatinine were measured by a semi-automatic biochemical analyzer (BioPlus-200), and their ratio obtained to define the UPC. Concomitantly, the urinalysis, including microscopic examination of sediment, was also performed.

### 2.7. IgG anti-*Leishmania* antibodies

Specific IgG anti-*Leishmania* antibodies were quantified in serum as previously described, using the indirect in-house ELISA test with modifications as previously mentioned (Gonçalves et al., 2020).

### 2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8.0 program (Prism Software, Irvine, CA, USA). The Shapiro-Wilk test revealed that the quantitative variables were distributed non-parametrically. Thus, the comparative data analysis was performed using Kruskal-Wallis statistical tests, followed by Dunn or Mann-Whitney tests. The level of significance adopted was  $p < 0.05$ . Data were expressed by median and percentiles.

## 3. Results

All median values of *L. infantum* parasitic loads, clinical scores, cell blood counts (CBC), serum anti-*Leishmania* immunoglobulins, biochemical and oxidative parameters, and of UPC of the studied dogs are detailed in Supplementary Table 2.

At T0, no significant differences were observed in the parasite load values between G1 and G2 dogs: the median (percentile) values were 7.38 (1.3–125,431) and 1,154 (131 to 13,451), respectively. Towards the end of the treatment, a tendency of decrease in the parasite loads was

observed in dogs of both G1 and G2 from T0 to T12, and this decrease was not statistically different between groups. However, when observing the frequency of dogs that had a decrease in their individual results (Supplementary Table 3) for *L. infantum* loads, 66.7 % (4/6) of the G1 dogs exhibited such a decrease versus only 41.7 % (5/12) of dogs of the G2 during the study.

Before initiating treatment (T0), the clinical staging was similar in groups G1 and G2, varying from mild to moderate CanL. In the first examination immediately at the end of treatment with anti-*Leishmania* drugs (metronidazole + ketoconazole) (T1), clinical improvement as given by scores was more substantial in the G1 than G2 ( $p = 0.0484$ ), although all dogs exhibited some clinical improvement already after 30 days of any treatment (Fig. 2). Dogs from G1 were categorized in the lowest clinical stage of CanL. As the treatment continued, both groups tended to show similar clinical staging. At six and 12 months after the beginning of the treatment, no statistical difference was observed in clinical scores between G1 and G2 dogs. Cell blood count (CBC) parameters were within the reference range in most dogs in G1 and G2, regardless of the treatment protocol established.

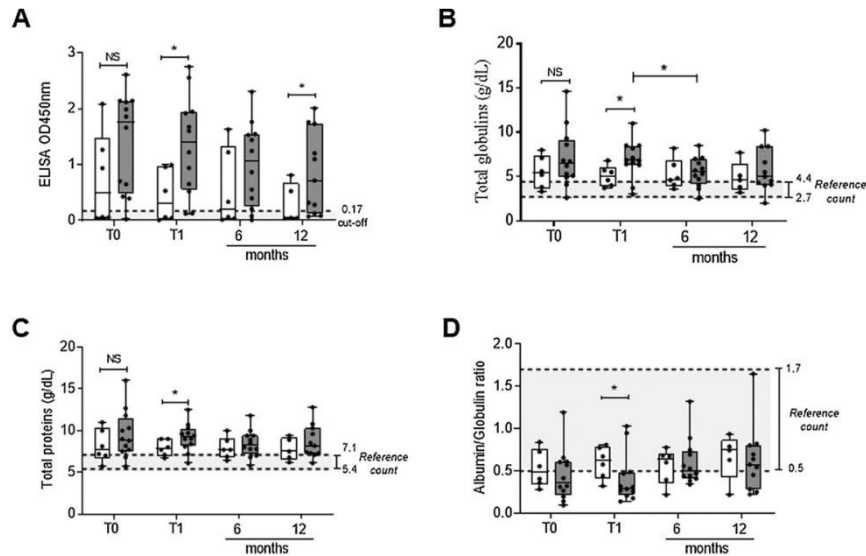
There was a statistical difference between G1 and G2 in the results of some serum parameters, indicating a beneficial effect of the early use of NAs on inflammation as seen at T1: dogs from G1 showed a greater

reduction in specific immunoglobulins ( $p = 0.016$ ), total globulins ( $p = 0.0247$ ), and total proteins ( $p = 0.031$ ), and an increased serum albumin/globulin ratio ( $p = 0.0334$ ) than dogs in G2 (Fig. 3). In the assessments at 6 and 12 months after the beginning of CanL treatment, all dogs were already using the same prescriptions (allopurinol associated with NAs). The biomarker C-reactive protein on G1 and G2 dogs at T6 returned to within the reference range. Albumin median values remained within the reference range in G1 dogs during the follow up, while an increase was observed within the G2 after the addition of NAs into the treatment, at T6 ( $p = 0.016$ ) and T12 ( $p = 0.043$ ).

At T1, TBARS (used to measure lipid peroxidation) remained levels equivalent to T0 within G1 dogs, while within G2 there was a statistically significant decrease in the same period ( $p = 0.0028$ ) (T1). However, at T6, both groups started to show an equivalent decrease in serum TBARS levels with the continuation of treatment, indicating a decrease in lipid oxidation. There was a decrease in protein oxidation from T1, as shown by the quantification of protein carbonyl groups (expressed as nanomoles of DNPH) in both groups at T0, regardless of the inclusion of NAs. In G2 dogs, serum glutathione levels increased in the first post-treatment assessment (T1), while in G1 dogs, these levels increased more significantly only at T6 ( $p = 0.0043$ ). However, with the continuation of treatment, oxidative parameters started to decrease, and



Fig. 2. Photographs of dogs with spontaneous canine leishmaniasis (CanL) before and after treatment with early (G1) or late (G2) nutritional adjuvants (NAs) in the course of protocols with anti-*Leishmania* drugs (ALDs) metronidazole and ketoconazole, followed by leishmaniostatic allopurinol. Photographs of dogs before treatment (T0), at the 30th-day treatment (T30) or at the 180th-day treatment (T180). G1 dogs, Rottweiler at T0 (A) and T30 (B); Mongrel at T0 (C,D) and T30 (E); Mongrel T0 (F) and T30 (G); G1 dogs had received at T30 only nutritional adjuvants (omega-3 PUFA and B vitamins) during 30 days. G2 dogs, Rottweiler at T0 (H); this dog had his muzzle tied because of aggressiveness, notably reported during anamnesis as an abnormal behavior even towards family members) and T30 (I); Mongrel at T0 (J) and T30 (L); Australian Short-Haired Cattle Dog at T0 (N) and T30 (O); G2 dogs had received at T30 only ALDs during 30 days. This Mongrel G2 dog had received at T180 (M) the complete 40-day course of ALD, and was currently receiving allopurinol (added from day 41) and nutritional adjuvants (omega-3 PUFA and B vitamins) added from day 60 (to compare with J and L).



**Fig. 3.** Amelioration of inflammatory markers in dogs administered early (G1) or late (G2) nutritional adjuvants (NAs) in the course of treatment for spontaneous canine leishmaniasis (CanL) with anti-*Leishmania* drugs (ALDs) metronidazole and ketoconazole, followed by leishmaniostatic allopurinol. Dogs with CanL from the G1 group, whose initial treatment was NAs (omega-3 PUFA and B vitamins), showed lower values of specific immunoglobulins (A) and total globulins (B), total serum proteins (C), and return back to normality of the A/G (D) ratio at T1 when compared with G2. Data in medians and percentiles. \* $p < 0.05$ .

antioxidant markers increased in both groups until the end of the study.

We have further evaluated biomarkers related to urinary functions in both groups. After having received ALDs associated with early (G1) or late (G2) NA addition, the dogs exhibited a decrease in the median serum uric acid concentrations at T6, resulting in final values consistent with the reference range for canine values. G2 dogs exhibited an increase in magnesium levels at T1 ( $p = 0.0026$ ) before starting NAs and in the six and 12-month assessments when they were already using adjuvants ( $p < 0.001$ ). Despite hypomagnesemia, calcium and phosphorus levels were within the reference range for the canine species in most G2 dogs. However, phosphorus values tended to decrease over time during treatment. There was a decrease of proteinuria towards normal values in most dogs of G1 and G2, followed by a decrease in the urinary protein-creatinine ratio (UPC), which was significant at T6 in the G2 dogs after initiation of NAs ( $p = 0.0114$ ). The parameters B2-microglobulin, urea, creatinine and were within the reference values in both groups in all evaluations.

Serum HDL and LDL levels were higher in G1 than in G2 dogs at T1, that is, at the end of the treatment course with ALDs, while triglycerides were stable within reference values in both dog groups during and until the end of treatment. The measurement of the GGT differed ( $p = 0.0253$ ) between the groups from the first evaluation (T0), with higher values in the G2 dogs. However, during treatment at T6, there was an increase in sera levels of this enzyme in G1 dogs followed by a return to reference values at T12.

#### 4. Discussion

The search for new therapeutic protocols is crucial to expand options for the management of zoonotic *L. infantum* infection since dogs are susceptible to the development of severe CanL. As infection by protozoa of the genus *Leishmania* generates oxidative stress in the host cells (Almeida et al., 2013), reestablishing the redox balance by administering nutritional adjuvants (NA) could be a therapeutic goal for CanL

management.

The groups differed in the initiation of NAs in the therapeutic protocol: G1 dogs started receiving them earlier, 30 days before the anti-*Leishmania* drugs, while G2 dogs started NAs later, 20 days after the end of ALDs treatment. At the end of the study, both groups exhibited similar amelioration in parasite loads and clinical staging, indicating comparable therapeutic success. However, data from the group administered NAs earlier demonstrated improvement in clinical and biomarkers of inflammation before the other group. Notably, dogs that were receiving only NAs at the 30th day of evaluation, thus even before starting the course of anti-*Leishmania* drugs, already exhibited a substantial clinical improvement in relation to T0 (Fig. 2A–G). We attribute the lack of statistical difference of amelioration indices between the groups to the considerable dispersion of values within each group, which reflected a degree of individual heterogeneity, and relative to the low number of dogs remaining in the groups at the end of the study. In a previous report, we showed two distinct dog profiles at the end of the 12-month follow-up, which we classified as responders and non-responders according to the resultant parasitic load of *L. infantum* independent of the treatment received (Gonçalves et al., 2020). In the present report, our objective was to observe the extent of differences over time of NA administration, and within both groups of the present study there were responders and non-responders, which made the groups comparable. The literature is rich in studies showing that individual factors, both genetic and epigenetic, are intrinsically involved in response to leishmaniasis treatment (Vanaerschot et al., 2014; Carnielli et al., 2018; Afrin et al., 2019). We observed a higher frequency of dogs presenting clinical and parasitological improvement within the group receiving early NAs.

The early addition of NAs in anti-*Leishmania* drug treatment resulted in an earlier decrease of inflammation, expressed by lower serum levels of total globulins, specific anti-*Leishmania* immunoglobulins, and C-reactive protein. Omega-3 PUFA compounds can inhibit several inflammatory mechanisms, such as leukocyte chemotaxis and pro-inflammatory cytokine production (Calder, 2017). Studies have

demonstrated the benefits of oral omega-3 PUFA use in canine pathologies such as osteoarthritis (Barrouin-Melo et al., 2016), renal pathology (Brown et al., 1998), cardiac pathology (Smith et al., 2007), and in behavioral disorders (Rahimi Niyyat et al., 2018). Recently, some authors have investigated and described the benefits of using NAs in CanL therapy (Lombardi et al., 2019; Mastellone et al., 2020). Possibly, the consumption of omega-3 PUFA in G1 in that interval resulted in a greater supply of unsaturated fatty acids, and therefore a greater availability of substrates for lipid peroxidation thus higher TBARS. Other authors have listed lipid peroxidation among potential adverse effects of supplementing dogs with omega-3 PUFA from fish oil, emphasizing that EPA and DHA can deposit on the body's cell membranes and undergo lipid peroxidation by hydroxyl radicals (Burton and Jauniaux, 2011; Lenox and Bauer, 2013). However, in the present study, we cannot consider the persistence of high TBARS observed in the group that was consuming omega-3 PUFA (G1) as an adverse effect of this NA, since the biomarkers of inflammation and renal function accompanied a substantial clinical recovery in these dogs. Delayed epithelium healing was also listed among potential harmful effects omega-3 PUFA supplementation (Lenox and Bauer, 2013). However, we emphasize that although most dogs in both groups were presenting an abundance of dermatological lesions at T0, no healing deficiency was observed specifically for this clinical CanL sign at T1 or other monitoring times in the present study. Indeed, skin improvement was among the first observed signs of health recovery in both groups and was no different in early receivers of omega-3 PUFA even at the first evaluation post-treatment (T1) when the other group had not yet received NAs. Moreover, we administered omega-3 PUFA in concentrations by weight, equivalent to 1,000 mg/kg. This is below the upper safe administration limit for dogs, determined as 2,080 mg/kg according to animal nutrition studies (Lenox and Bauer, 2013). In veterinary medicine, several nutritional supplements are still empirically administered in the medical clinic, without scientific data supporting the precise doses recommended for each pathology (Brown et al., 1998; Smith et al., 2007; Rahimi Niyyat et al., 2018; Westgarth et al., 2018).

The observed decrease on lipid oxidation markers in both groups at the end of the study might be attributed to the overall control of general inflammation resulting from the administration of omega-3 PUFA, as seen in G1 at T1. Previous studies have shown that antioxidant nutraceuticals have a protective effect on cell membranes, resulting in less tissue cell death and less inflammation, attributable to homeostatic processes removing debris in inflammatory diseases (Suphioglu et al., 2010; Bauer, 2011). Thus, we can hypothesize that in the present study, both the use of omega-3 PUFA and vitamin B complex might have helped control oxidation due to tissue damage while minimizing inflammation, as seen in some parameters in G1 at T1 and in both groups at T6 and T12. Vitamins of the B complex are a group of eight essential water-soluble vitamins that function as coenzymes in several enzymatic reactions essential to redox homeostasis, such as the citric acid cycle, redox cycle of glutathione reductase or synthesis of hemoglobin (Kennedy, 2016; Barrouin-Melo et al., 2018).

Allopurinol has been described as a drug with leishmanostatic activity (Ginel et al., 1998), but it also has antioxidant properties, removing hydroxyl radicals (Buonocore and Groenendaal, 2007). In the evaluation made after the end of the course of ALDs metronidazole/ketoconazole, and during the 20 days initial days of allopurinol administration (T1), only the dogs that received early NAs (G1) exhibited reduced serum levels of inflammation markers. However, both TBARS and DNPB decreased over time up to the end of the study (T6 and T12). Antioxidant effects of allopurinol may have contributed at some degree to the amelioration of the inflammation and the redox balance outcomes. As an inhibitor of xanthine oxidase (Klein et al., 1996), allopurinol has an antioxidant activity with beneficial clinical effects as demonstrated in previously (Rachmat et al., 2013). Another positive therapeutic effect of allopurinol observed in the present study was on the serum uric acid level. Dogs from both groups exhibited high serum uric

acid concentrations before treatment and a decline in these values to within reference range 6- and 12-months post-treatment. Elevations of serum concentrations of uric acid can occur in dogs due to renal dysfunction (Thrall et al., 2014). By inhibiting xanthine oxidase, an enzyme that cleaves purine into uric acid (Graham et al., 1996), allopurinol therapeutic effects on CanL included renal protection, as seen in the present study. Moreover, hypomagnesemia and hyperphosphatemia which had been observed before treatment tended to return to reference values as treatment progressed, as well as on proteinuria, an important marker of CanL severity (Solano-Gallego et al., 2011; Meléndez-Lazo et al., 2018). Beta-2 microglobulin, a microprotein marker of renal tubular injury in human patients with visceral leishmaniasis (Vitale et al., 1994), has not been previously studied in the sera of dogs with CanL.

To the best of our knowledge, no study on nutritional adjuvants in the treatment of dogs with natural chronic infections such as CanL has reported such an impact on lipoproteins. In humans, it has been reported that the clinical use of omega-3 PUFA under different conditions can increase blood HDL and LDL while lowering triglycerides (Harris, 1996; Paranandi et al., 2014; Oscarsson and Hurt-Camejo, 2017; Ide et al., 2018). Nevertheless, in the context of the present results we must consider that a higher blood HDL might have helped in the reduction of inflammatory biomarkers. Mechanisms by which HDL may modulate inflammation have been proposed in the literature (Ben-Aicha et al., 2020). According to the literature, increased plasma GGT in dogs is associated with cholestasis, particularly concomitant with alterations in other liver dysfunction biomarkers – ALP, ALT, urea, albumin, cholesterol, or triglycerides (Whitfield, 2001; Thrall et al., 2014). We assume this transient GGT increase as a compensatory mechanism for the early supply of omega-3 PUFA, thus elevating the availability of lipidic substrates for oxidation, which might have enhanced the demand for glutathione synthesis. Indeed, GGT acts as a catalyst for the transfer of glutamyl groups to maintain intracellular glutathione levels (Whitfield, 2001). In this sense, GGT in high concentrations is an early predictive marker for atherosclerosis and heart disease in humans (Mason et al., 2010; Bradley et al., 2014; Koenig and Senef, 2015). However, such GGT metabolic roles are not as clear in the canine species and should be studied further.

The present study had strengths and limitations. The sample number of dogs receiving follow-up until the end of the study was small, likely because the study was relatively long. The present study would have benefited from a much larger number of cases. However, our data indicate that a redox imbalance seems to be a relevant aspect in the pathophysiology of CanL since the positive effects of the treatment protocol that included NAs were observed in multiple relevant clinical parameters. In a larger study, it would be worthwhile to clarify to what extent NAs or allopurinol or the combination of these substances and drugs might impact the redox balance and inflammation control in canine CanL patients.

## 5. Conclusions

Our data demonstrates that the use of nutritional adjuvants helped to regulate inflammation, as depicted by a decrease of total globulins, specific anti-*Leishmania* immunoglobulins, and an increase in serum albumin/globulin ratio in dogs treated for CanL. The treatment using anti-*Leishmania* drugs associated with early omega-3 PUFA and B vitamins also earlier improved clinical alterations that indicate the normalization of renal function and lipid and protein peroxidation. This study raised multiple questions to be explored in studies with larger canine populations that seek to understand better the impact of nutritional adjuvants in CanL therapy, such as the effects of nutritional adjuvants on HDL, LDL, triglycerides, GGT, and oxidative stress markers.

### CRedit authorship contribution statement

**Rafaela de Sousa Gonçalves:** Investigation, Writing – Draft preparation, Data Curation, Reviewing. **Flaviane Alves de Pinho:** Methodology, Resources, Validation, Data Curation, Reviewing & Editing. **Ricardo Jorge Dinis-Oliveira:** Methodology, Validation, Reviewing. **Mariana Oliveira Mendes:** Investigation. **Tiago Sena de Andrade:** Investigation. **Manuela da Silva Solcá:** Formal analysis, Software, Reviewing. **Daniela Farias Larangeira:** Investigation, Writing – Draft preparation. **Ricardo Silvestre:** Methodology, Conceptualization, Resources, Validation, Formal analysis, Software, Writing – Reviewing & Editing. **Stella Maria Barrouin-Melo:** Conceptualization, Supervision, Methodology, Formal analysis, Funding acquisition, Project administration, Writing – Reviewing & Editing.

### Data availability statement

The data that supports the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

### Animal welfare and ethics

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to and the appropriate ethical review committee approval has been received. The authors confirm that they have adhered to international standards for the protection of animals used for scientific purposes. For more details, see section 2.1 of this manuscript.

### Author contributions

Conceptualization SMBM, RS, FAP; methodology, SMBM, RS, FAP; formal analysis, RSG, FAP, RJDO, NH, RS, SMBM; investigation, RSG, FAP, RJDO, MOM, TSA, DFL, RS, SMBM; resources, RJDO, RS and SMBM; data curation, RSG, FAP, MSS, RS, SMBM; writing - original draft preparation, RSG, FAP, RS, SMBM; writing - review and editing, RS, NH, SMBM; supervision, SMBM and RS; project administration, SMBM and RS; funding acquisition, SMBM, RJDO and RS. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

### Acknowledgements

This work was funded by the Brazilian agencies Bahia State Research Support Foundation–FAPESB (Grant n° PRONEM 498/2011-PNE 0002/2011 to SMBM), National Council for Scientific and Technological Development–CNPq (PQ scholarship n° 307813/2018-5 to SMBM), and Coordination for Improvement of Higher Education Personnel–CAPES (Finance Code 001: PDSE scholarship n° 88881.189587/2018-01 to RSG and PV scholarship n° 23066.033859/2018-73 to R.S.). This work was also supported by grants from CESPÚ (TramTap-CESPÚ-2016, Chronic-TramTap\_CESPÚ\_2017, and TraTapMDMA-CESPÚ-2018); from the Northern Portugal Regional Operational Programme (NORTE 2020), under the Portugal 2020 Partnership Agreement, through the European Regional Development Fund (FEDER) (NORTE-01-0145-FEDER-000013) and COMPETE2020-Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI); from the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (contract IF/00021/2014 to RS); and from Infect-Era (project INLEISH). We thank Prof. Nicole Hlavac for her critical review. We thank Marina Rossi, Joana Barbosa, and Juliana Farias for technical

support.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109526>.

### References

- Afrin, F., Khan, I., Hemeg, H.A., 2019. *Leishmania*-host interactions-an epigenetic paradigm. *Front. Immunol.* 10, 1–9.
- Almeida, B.F.M., Narciso, L.G., Melo, L.M., Preve, P.P., Bosco, A.M., Lima, V.M.F., Ciarlini, P.C., 2013. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. *Vet. J.* 198, 599–605.
- Alves, C.F., de Amorim, I.F.G., Moura, E.P., Ribeiro, R.R., Alves, C.F., Michalick, M.S., Kalapothakis, E., Bruna-Romero, O., Tafuri, W.L., Teixeira, M.M., Melo, M.N., 2009. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 349–358.
- Angiulli, G., Lantella, A., Forte, E., Angelucci, F., Colotti, G., Ilari, A., Malatesta, F., 2015. *Leishmania infantum* trypanothione reductase is a promiscuous enzyme carrying an NADPH: O2 oxidoreductase activity shared by glutathione reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 1891–1897.
- Backes, J., Anzalone, D., Hilleman, D., Catini, J., 2016. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis.* 15, 1–12.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24, 324–330.
- Barbosa, J., Faria, J., Leal, S., Afonso, L.P., Lobo, J., Queirós, O., Moreira, R., Carvalho, F., Dinis-Oliveira, R.J., 2017. Acute administration of tramadol and tapentadol at effective analgesic and maximum tolerated doses causes hepato- and nephrotoxic effects in Wistar rats. *Toxicology.* 389, 118–129.
- Barrouin-Melo, S.M., Anturaniemi, J., Sankari, S., Grinari, M., Atroshi, F., Ounjaijean, S., Hielm-Björkman, A.K., 2016. Evaluating oxidative stress, serological- and haematological status of dogs suffering from osteoarthritis, after supplementing their diet with fish or corn oil. *Lipids Health Dis.* 15, 1–17.
- Barrouin-Melo, S.M., Morejón-Terán, Y., Anturaniemi, J., Hielm-Björkman, A., 2018. Interaction between nutrition and metabolism. In: Silvestre, E., R., Torrado, E. (Eds.), *Metabolic Interaction in Infection*. Springer, pp. 29–114.
- Bauer, J.E., 2011. Timely topics in nutrition therapeutic use of fish oils. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 239, 1441–1451.
- Ben-Aicha, S., Badimon, L., Vilahur, G., 2020. Advances in HDL: much more than lipid transporters. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–18.
- Bildik, A., Kargin, F., Seyrek, K., Pasa, S., Ozensoy, S., 2004. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 77, 63–66.
- Bradley, R., Fitzpatrick, A., Jacobs Jr., D., Lee, D.-H., Jenny, N., Herrington, D., 2014. Associations between  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) and biomarkers of atherosclerosis: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis.* 233, 387–393.
- Brasil, 2018. Guia de orientação para vigilância de leishmaniose visceral canina (LVC). Retrieved October 14, 2017 from [http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zooses/publicacoes/Guia\\_Basico\\_de\\_Orientacao\\_LVC\\_2018.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zooses/publicacoes/Guia_Basico_de_Orientacao_LVC_2018.pdf).
- Braz-De-Melo, H.A., Pasquarelli-do-Nascimento, G., Correa, R., das Neves Almeida, R., de Oliveira Santos, L., Prado, P.S., Picolo, V., Fabro de Bem, A., Pizato, N., Magalhães, K. G., 2019. Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. *Sci. Rep.* 9, 1–12.
- Brown, S.A., Brown, C.A., Crowell, W.A., Barsanti, J.A., Allen, T., Cowell, C., Finco, D.R., 1998. Beneficial effects of chronic administration of dietary  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in dogs with renal insufficiency. *J. Lab. Clin. Med.* 131, 447–455.
- Buonocore, G., Groenendaal, F., 2007. Anti-oxidant strategies. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 12, 287–295.
- Burton, G.J., Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25, 287–299.
- Butler, C.C., Vidal-Alaball, J., Cannings-John, R., McCaddon, A., Hood, K., Papaioannou, A., Medowell, L., Goringe, A., 2006. Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency: a systematic review of randomized controlled trials. *Fam. Pract.* 23, 279–285.
- Calder, P.C., 2017. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem. Soc. Trans.* 45, 1105–1115.
- Carnielli, J.B.T., Crouch, K., Forrester, S., Silva, V.C., Carvalho, S.F.G., Damasceno, J.D., Brown, E., Dickens, N.J., Costa, D.L., Costa, C.H.N., Dietze, R., Jeffares, D.C., Mottram, J.C., 2018. A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. *EBioMedicine* 36, 83–91.
- Cortese, L., Annunziata, M., Palatucci, A.T., Lanzilli, S., Rubino, V., Di Cerbo, A., Centenaro, S., Guidetti, G., Canello, S., Terrazzano, G., 2015. An immune-modulating diet increases the regulatory T cells and reduces T helper 1 inflammatory response in Leishmaniasis affected dogs treated with standard therapy. *BMC Vet. Res.* 11, 1–11.
- da Costa-Val, A.P., Cavalcanti, R.R., de Figueiredo Gontijo, N., Michalick, M.S.M., Alexander, B., Williams, P., Melo, M.N., 2007. Canine visceral leishmaniasis:

- relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet. J.* 174, 636–643.
- DeFilippis, A.P., Sperling, L.S., 2006. Understanding omega-3's. *Am. Heart J.* 151, 564–570.
- Dimri, U., Ranjan, R., Kumar, N., Sharma, M.C., Swarup, D., Sharma, B., Kataria, M., 2008. Changes in oxidative stress indices, zinc and copper concentrations in blood in canine demodicosis. *Vet. Parasitol.* 154, 98–102.
- Freitas, R.D.S., Campos, M.M., 2019. Protective effects of Omega-3 fatty acids in cancer-related complications. *Nutrients* 11, 1–23.
- Ginel, P.J., Lucena, R., Lopez, R., Molleda, M., 1998. Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.* 39, 271–274.
- Gonçalves, R.D.S., de Pinho, F.A., Dinis-Oliveira, R.J., Azevedo, R., Gaifem, J., Larangeira, D.F., Ramos-Sanchez, E.M., Goto, H., Silvestre, R., Barrouin-Melo, S.M., 2020. Mathematical modelling using predictive biomarkers for the outcome of canine leishmaniasis upon chemotherapy. *Microorganisms* 8, 1–15.
- Graham, S., Day, R.O., Wong, H., McLachlan, A.J., Bergendal, L., Miners, J.O., Birkett, D.J., 1996. Pharmacodynamics of oxypurinol after administration of allopurinol to healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 41, 299–304.
- Groth, E.M., Chew, D.J., Lulich, J.P., Tommet, M., Rendahl, A.K., Husbands, B.D., Furrow, E., 2020. Determination of a serum total calcium concentration threshold for accurate prediction of ionized hypercalcemia in dogs with and without hyperphosphatemia. *J. Vet. Intern. Med.* 34, 74–82.
- Harris, W.S., 1996. n-3 Fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. *Lipids* 31, 243–252.
- Heidarpour, M., Soltani, S., Mohri, M., Khoshnegah, J., 2012. Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements and clinical status. *Parasitol. Res.* 111, 1491–1496.
- Ide, K., Koshizaka, M., Tokuyama, H., Tokuyama, T., Ishikawa, T., Maezawa, Y., Takemoto, M., Yokote, K., 2018. N-3 polyunsaturated fatty acids improve lipoprotein particle size and concentration in Japanese patients with type 2 diabetes and hypertriglyceridemia: a pilot study. *Lipids Health Dis.* 17, 1–9.
- Ikeda-Garcia, F.A., Lopes, R.S., Marques, F.J., de Lima, V.M.F., Morinishi, C.K., Bonello, F.L., Zanette, M.F., Perri, S.H.V., Feitosa, M.M., 2007. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 143, 254–259.
- Kaneko, J., Harvey, J., Bruss, M. (Eds.), 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, p. 396.
- Kennedy, D.O., 2016. B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy—a review. *Nutrients* 8, 1–29.
- Klein, A.S., Joh, J.W., Rangan, U., Wang, D., Bulkley, G.B., 1996. Allopurinol: discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 713–717.
- Koenig, G., Seneff, S., 2015. Gamma-glutamyltransferase: a predictive biomarker of cellular antioxidant inadequacy and disease risk. *Dis. Markers* 2015, 1–18.
- Laskay, T., Van Zandbergen, G., Solbach, W., 2003. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 11, 210–214.
- Lenox, C.E., Bauer, J.E., 2013. Potential adverse effects of omega-3 fatty acids in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 217–226.
- Lombardi, P., Palatucci, A.T., Giovazzino, A., Mastellone, V., Ruggiero, G., Rubino, V., Musco, N., Crupi, R., Cutrignelli, M.L., Britti, D., Vassalotti, G., Terrazzano, G., Cortese, L., 2019. Clinical and immunological response in dogs naturally infected by *L. infantum* treated with a nutritional supplement. *Animals* 9, 1–14.
- Macopet, A., Suksawat, F., Sukon, P., Pimpakdee, K., Pattarapanwichien, E., Tangrassameprasert, R., Boonsiri, P., 2013. Oxidative stress in cancer-bearing dogs assessed by measuring serum malondialdehyde. *BMC Vet. Res.* 9, 1–6.
- Manna, L., Reale, S., Viola, E., Vitale, F., Manzillo, V.F., Michele, P.L., Caracappa, S., Gravino, A.E., 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 142, 271–280.
- Manna, L., Corso, R., Gallero, G., Cerrone, A., Muzj, P., Gravino, A.E., 2015. Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasit. Vectors* 8, 1–9.
- Martins, M.J., Roque Bravo, R., Enea, M., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos, M., de, L., Dinis-Oliveira, R.J., Dias da Silva, D., 2018. Ethanol additively enhances the in vitro cardiotoxicity of cocaine through oxidative damage, energetic deregulation, and apoptosis. *Arch. Toxicol.* 92, 2311–2325.
- Mason, J.E., Starke, R.D., Van Kirk, J.E., 2010. Gamma-glutamyl transferase: a novel cardiovascular risk biomarker. *Prev. Cardiol.* 13, 36–41.
- Mastellone, V., Musco, N., Vassalotti, G., Piantedosi, D., Vastolo, A., Cutrignelli, M.L., Britti, D., Cortese, L., Lombardi, P., 2020. A nutritional supplement (DilshTM) improves the inflammatory cytokines response, oxidative stress markers and clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Animals* 10, 1–12.
- Meléndez-Lazo, A., Ordeix, L., Planellas, M., Pastor, J., Solano-Gallego, L., 2018. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: comparison of five different clinical classification systems. *Res. Vet. Sci.* 117, 18–27.
- Onishi, T., Inokuma, H., Ohno, K., Soeda, S., Noguchi, K., Sasaki, K., 2000. C-reactive Protein concentrations in normal and diseased dogs—measured by laser nephelometric immunoassay. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 595–601.
- Oscarsson, J., Hurt-Camejo, E., 2017. Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their mechanisms of action on apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans: A review. *Lipids Health Dis.* 16, 1–13.
- Paltrinieri, S., 2013. Oxidative stress and canine leishmaniasis: more than a simple consequence of host – parasite interaction. *Vet. J.* 198, 547–548.
- Paltrinieri, S., Ravicini, S., Rossi, G., Roura, X., 2010. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniasis. *Vet. J.* 186, 393–395.
- Papacore, R., Fiorentino, E., Cappiello, S., Gizzarelli, M., Gradoni, L., Oliva, G., Manzillo, V.F., 2013. Sternal aspiration of bone marrow in dogs: a practical approach for canine leishmaniasis diagnosis and monitoring. *J. Vet. Med.* 2013, 1–4.
- Paranandi, A., Asztalos, B.F., Mangili, A., Kuvin, J., Gerrior, J., Sheehan, H., Skinner, S.C., Tang, A.M., Wanke, C.A., 2014. Short communication: effects of omega-3 fatty acids on triglycerides and high-density lipoprotein subprofiles in HIV-infected persons with hypertriglyceridemia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 30, 800–805.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., Del Real, G., Ruitenbergh, J., 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229–235.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., 2017. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 1–13.
- Rachmat, F.D., Rachmat, J., Sastroasmoro, S., Wanandi, S.I., 2013. Effect of allopurinol on oxidative stress and hypoxic adaptation response during surgical correction of tetralogy of fallot. *Acta Med. Indones.* 45, 94–100.
- Rahimi Niyay, M., Azizzadeh, M., Khoshnegah, J., 2018. Effect of supplementation with omega-3 fatty acids, magnesium, and zinc on canine behavioral disorders: results of a pilot study. *Top. Companion Anim. Med.* 33, 150–155.
- Rolão, N., Cortes, S., Rodrigues, O.R., Campino, L., 2004. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by Real-Time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction – enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Parasitol.* 90, 1150–1154.
- Simopoulos, A.P., 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 438–463.
- Smith, C.E., Freeman, L.M., Rush, J.E., Cunningham, S.M., Biourge, V., 2007. Omega-3 fatty acids in boxer dogs with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 265–273.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2011. *LeishVet* guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 4, 1–16.
- Souza, C.C., Barreto, T.D.O., Silva, S.M., Pinto, A.W.J., Tafuri, W.L., Figueiredo, M.M., Rocha, O.G.F., Canguss, S.D., Tafuri, W.L., 2014. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. *Exp. Pathol.* 95, 260–270.
- Suphioglu, C., De Mel, D., Kumar, L., Sadli, N., Freestone, D., Michalczyk, A., Sinclair, A., Ackland, M.L., 2010. The omega-3 fatty acid, DHA, decreases neuronal cell death in association with altered zinc transport. *FEBS Lett.* 584, 612–618.
- Thomas, J., Thomas, C.J., Radcliffe, J., Itsiopoulos, C., 2015. Omega-3 fatty acids in early prevention of inflammatory neurodegenerative disease: a focus on Alzheimer's Disease. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–14.
- Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R.W., Campbell, T.W. (Eds.), 2014. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. Roca, p. 688.
- Torreilha, R.B.P., Utsunomiya, Y.T., Bosco, A.M., Almeida, B.F., Pereira, P.P., Narciso, L.G., Pereira, D.C.M., Baptistioli, L., Calvo-Bado, L., Courtenay, O., Nunes, C.M., Ciarlini, P.C., 2016. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev. Vet. Med.* 132, 83–87.
- Van Assche, T., Deschacht, M., Inocência, R.A., Maes, L., Cos, P., 2011. *Leishmania* – macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 337–351.
- Vanaerschot, M., Dumetz, F., Roy, S., Ponte-Sucre, A., Arevalo, J., Dujardin, J.C., 2014. Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype? *Expert. Rev. Anti. Infect.* 12, 937–946.
- Vitale, G., Mocciano, C., Gambino, G., Spinelli, A., Giordano, C., Stassi, G., 1994. Evaluation of serum levels of soluble CD4, CD8 and B2-microglobulin in visceral human leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 97, 280–283.
- Westgarth, S., Blois, S.L.D., Wood, R., Verbrugge, A., Ma, D.W., 2018. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids and aspirin, alone and combined, on canine platelet function. *J. Small Anim. Pract.* 59, 272–280.
- Whitfield, J.B., 2001. Gamma glutamyl transferase. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 38, 263–355.
- Zandi, P.P., Anthony, J.C., Khachaturian, A.S., Stone, S.V., Gustafson, D., Tschanz, J.A.T., Norton, M.C., Welsh-Bohmer, K.A., Breitner, J.C.S., 2004. Reduced risk of Alzheimer Disease in users of antioxidant vitamin supplements: the cache county study. *Arch. Neurol.* 61 (1), 82–88.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de adjuvantes nutricionais no tratamento da LCan contribuiu na melhora clínico-laboratorial do paciente, sobretudo com o controle inflamatório, por consequente redução sérica de globulinas totais, proteínas totais e imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania* em cães com leishmaniose naturalmente adquirida. O estresse oxidativo é evidente em animais doentes por LCan, porém com a terapêutica, incluindo utilização de fármacos anti-*Leishmania* e adjuvantes nutricionais, os níveis de peroxidação lipídica e proteica são reduzidos. Uma dicotomia foi vista no tratamento alternativo instituído nos cães, onde foram classificados como cães respondedores e não-respondedores da terapêutica baseados na redução da carga parasitária. E os eritrócitos e o fósforo sérico foram identificados como marcadores preditivos precoces da resposta terapêutica na LCan. Conjuntamente, os resultados apresentados neste estudo podem representar um novo modelo para fornecer assistência futura aos médicos veterinários na abordagem terapêutica, com uma definição mais precisa no manejo e prognóstico do paciente.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ALBOROUGH, R.; GRAU-ROMA, L.; DE BROT, S.; HANTKE, G.; VAZQUEZ, S.; GARDNER, D. S. Renal accumulation of prooxidant mineral elements and CKD in domestic cats. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 3160, 2020.
- ALMEIDA, B. F. M.; NARCISO, L. G.; MELO, L. M.; PREVE, P. P.; BOSCO, A. M.; LIMA, V. M. F.; CIARLINI, P. C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 599–605, 2013.
- ALMELA, R. M.; RUBIO, C. P.; CERÓN, J. J.; ANSÓN, A.; TICHY, A.; MAYER, U. Selected serum oxidative stress biomarkers in dogs with non-food-induced and food-induced atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 29, n. 3, p. 229-e82, 2018.
- ALVES, C. F.; DE AMORIM, I. F. G.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; MELO, M. N. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349–58, 15 abr. 2009.
- ANDRADE, H. M. et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 83–90, 2011.
- ANGIULLI, G.; LANTELLA, A.; FORTE, E.; ANGELUCCI, F.; COLOTTI, G.; ILARI, A.; MALATESTA, F. *Leishmania infantum* trypanothione reductase is a promiscuous enzyme carrying an NADPH: O<sub>2</sub> oxidoreductase activity shared by glutathione reductase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, n. 9, p. 1891–1897, 2015.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523–532, 1996.
- ASSCHE, T. VAN; DESCHACHT, M.; INOCÊNCIO, R. A.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania* – macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337–351, 2011.
- BACKES, J.; ANZALONE, D.; HILLEMANN, D.; CATINI, J. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2016.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis : part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 324–330, 2008.
- BARBOSA, J.; FARIA, J.; LEAL, S.; AFONSO, L. P.; LOBO, J.; QUEIRÓS, O.; MOREIRA, R.; CARVALHO, F.; DINIS-OLIVEIRA, R. J. Acute administration of tramadol and tapentadol at effective analgesic and maximum tolerated doses causes hepato- and

nephrotoxic effects in Wistar rats. **Toxicology**, v. 389, p. 118–129, 2017.

BARBOSA, K.; COSTA, N.; ALFENAS, R. DE C.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARBOSA, V. T.; SILVA, M. A. G.; SOUSA, M. G.; GERING, A. P.; SANTOS, H. D.; LAUS, J. L. Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 6, p. 1465–1470, 2012.

BARROUIN-MELO, S. M.; ANTURANIEMI, J.; SANKARI, S.; GRINARI, M.; ATROSHI, F.; OUNJAIJEAN, S.; HIELM-BJÖRKMAN, A. K. Evaluating oxidative stress, serological- and haematological status of dogs suffering from osteoarthritis, after supplementing their diet with fish or corn oil. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2016.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; DE ANDRADE FILHO, F. A.; TRIGO, J.; JULIÃO, F. S.; FRANKE, C. R.; PALIS AGUIAR, P. H.; CONRADO DOS-SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 171, n. 2, p. 331–9, mar. 2006.

BARROUIN-MELO, S. M.; MOREJÓN TERÁN, Y. A.; ANTURANIEMI, J.; HIELM-BJÖRKMAN, A. K. Interaction Between Nutrition and Metabolism. In: SILVESTRE, RICARDO, TORRADO, E. (Ed.). **Metabolic Interaction in Infection**. [s.l.] Springer, 2018. p. 29–114.

BAUER, J. E. Timely Topics in Nutrition Therapeutic use of fish oils. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 239, n. 11, p. 1441–1451, 2011.

BEN-AICHA, S.; BADIMON, L.; VILAHUR, G. Advances in HDL: Much more than lipid transporters. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1–18, 2020.

BHATTACHARYYA, T. et al. IgG1 as a Potential Biomarker of Post-chemotherapeutic Relapse in Visceral Leishmaniasis, and Adaptation to a Rapid Diagnostic Test. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 1–6, 2014.

BILDIK, A. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. v. 77, p. 63–66, 2004.

BOARINO, A.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; FERROGLIO, E.; VITALE, F.; ZANATTA, R.; GIUFFRIDA, M. G.; ROSATI, S. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 5, p. 647–653, 2005.

BOLOGA, R. M.; LEVINE, D. M.; PARKER, T. S.; CHEIGH, J. S.; SERUR, D.; STENZEL, K. H.; RUBIN, A. L. Interleukin-6 Predicts Hypoalbuminemia, Hypocholesterolemia, and Mortality in Hemodialysis Patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 32, n. 1, p. 107–114, 1998.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J. P.; SAINT-ANDRÉ, I.;

CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 56, n. 3–4, p. 345–351, 1997.

BRADLEY, R.; FITZPATRICK, A.; JACOBS JR, D.; LEE, D.-H.; JENNY, N.; WAKE, D. H. Associations between  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) and Biomarkers of Atherosclerosis: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*, n. 673–702, p. 771–792, 2014.

BRASIL. **Decreto nº 51.838. Normas Técnicas Especiais para o Combate às Leishmanioses.** Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1950-1969/D51838.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D51838.htm)>.

BRASIL. **Portaria Interministerial Nº 1.426. Leishmanioses.** Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426\\_11\\_07\\_2008.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html)>.

BRASIL. **Portaria Interministerial n 1.426/2018.** Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426\\_11\\_07\\_2008.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html)>.

BRASIL. **Nota Técnica Conjunta nº 001/2016.** Disponível em: <<https://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>>.

BRASIL. **Guia de Orientação para Vigilância de Leishmaniose Visceral Canina (LVC).** Disponível em: <[http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia\\_Basico\\_de\\_Orientacao\\_LVC\\_2018.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia_Basico_de_Orientacao_LVC_2018.pdf)>. Acesso em: 14 out. 2017.

BRAZ-DE-MELO, H. A.; PASQUARELLI-DO-NASCIMENTO, G.; CORRÊA, R.; DAS NEVES ALMEIDA, R.; DE OLIVEIRA SANTOS, I.; PRADO, P. S.; PICOLO, V.; DE BEM, A. F.; PIZATO, N.; MAGALHÃES, K. G. Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

BROWN, S. A.; BROWN, C. A.; CROWELL, W. A.; BARSANTI, J. A.; ALLEN, T.; COWELL, C.; FINCO, D. R. Beneficial effects of chronic administration of dietary  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in dogs with renal insufficiency. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 131, n. 5, p. 447–455, 1998.

BUONOCORE, G.; GROENENDAAL, F. Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, v. 12, n. 4, p. 287–295, 2007.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 25, n. 3, p. 287–299, 2011.

CALDER, P. C. Immunonutrition. *British Medical Journal*, v. 327, n. 7407, p. 117–118, 2003.

CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man. *Biochemical Society Transactions*, v. 45, n. 5, p. 1105–1115, 2017.

CARNIELLI, J. B. T.; CROUCH, K.; FORRESTER, S.; SILVA, V. C.; CARVALHO, S. F. G.; DAMASCENO, J. D.; BROWN, E.; DICKENS, N. J.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N.; DIETZE, R.; JEFFARES, D. C.; MOTTRAM, J. C. A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. *EBioMedicine*, v. 36, p. 83–91, 2018.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 67–70, 15 mar. 2009.

CENTER, S. A.; WARNER, K. L.; ERB, H. N. Liver glutathione concentrations in dogs and cats with naturally occurring liver disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 8, p. 1187–1197, 2002.

CHEN, T.; GIONFRIDDO, J. R.; TAI, P. Y.; NOVAKOWSKI, A. N.; ALYAHYA, K.; MADL, J. E. Oxidative stress increases in retinas of dogs in acute glaucoma but not in chronic glaucoma. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. 4, p. 261–270, 2015.

CIARAMELLA, P. Canine Leishmaniasis : Therapeutic Aspects \*. **Compendium**, v. 25, n. 5, p. 370–375, 2003.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539–543, 1997.

CORTESE, L.; ANNUNZIATELLA, M.; PALATUCCI, A. T.; LANZILLI, S.; RUBINO, V.; DI CERBO, A.; CENTENARO, S.; GUIDETTI, G.; CANELLO, S.; TERRAZZANO, G. An immune-modulating diet increases the regulatory T cells and reduces T helper 1 inflammatory response in Leishmaniosis affected dogs treated with standard therapy. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2015.

CORZO, L.; FERNÁNDEZ-NOVOA, L.; CARRERA, I.; MARTÍNEZ, O.; RODRÍGUEZ, S.; ALEJO, R.; CACABELOS, R. Nutrition, health, and disease: Role of selected marine and vegetal nutraceuticals. **Nutrients**, v. 12, n. 3, 2020.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232–42, 2011.

COSTA, I.; CARVALHO, F.; MAGALHÃES, T.; GUEDES DE PINHO, P.; SILVESTRE, R.; DINIS-OLIVEIRA, R. J. Promising blood-derived biomarkers for estimation of the postmortem interval. **Toxicology Research**, v. 4, p. 1443–1452, 2015.

COSTA, S. F.; GOMES, V. O.; MACIEL, M. O. D. S.; MELO, L. M.; VENTURIN, G. L.; BRAGATO, J. P.; REBECH, G. T.; SANTOS, C. DE O.; DE OLIVEIRA, B. M. N.; DE SÁ OLIVEIRA, G. G.; DE LIMA, V. M. F. Combined in vitro IL-12 and IL-15 stimulation promotes cellular immune response in dogs with visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–21, 2020.

CRUPI, R.; GUGLIANDOLO, E.; SIRACUSA, R.; IMPELLIZZERI, D.; CORDARO, M.; PAOLA, R. DI; BRITTI, D.; CUZZOCREA, S. N-acetyl-L-cysteine reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in BALB / c mice. **Veterinary Research**, v. 16, n. 13, p. 1–12, 2020.

DA COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MARQUES MICHALICK, M. S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636–643, 2007.

DA SILVA, S.; AMORIM, I. F. G.; RIBEIRO, R. R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARD, F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 2858–2867, 2012a.

DA SILVA, S. M.; AMORIM, I. F. G.; RIBEIRO, R. R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARD, F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 2858–2867, 2012b.

DA SILVEIRA, A. P. S.; VIEIRA, V. B. D.; BATALINI, L. S.; DO CARMO, S. B.; FRIOZI, E.; DE ARRUDA, E. J.; LIMA JUNIOR, M. S. DA C.; NEITZKE-ABREU, H. C. PCR sensitivity of peripheral blood of dogs co-infected with *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp. in endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 6, p. 843–847, 2018.

DALIU, P.; SANTINI, A.; NOVELLINO, E. A decade of nutraceutical patents: where are we now in 2018? **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 28, p. 875–882, 2018.

DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G.; BOWMAN, D. D.; GRADONI, L.; OTRANTO, D. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 97–101, 2019.

DE PINHO, F. A.; VENDRAME, C. M. V.; MACIEL, B. L. L.; DOS SANTOS SILVA, L.; MIYASHIRO, S. I.; JERÔNIMO, S. M. B.; GOTO, H. Association between insulin-like growth factor-I levels and the disease progression and anemia in visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 4, p. 808–815, 2019.

DEFILIPPIS, A. P.; SPERLING, L. S. Understanding omega-3's. **American Heart Journal**, v. 151, n. 3, p. 564–570, 2006.

DENEROLLE, P.; BOURDOISEAU, G. Combination Allopurinol and Antimony Treatment versus Antimony Alone and Allopurinol Alone in the Treatment of Canine Leishmaniasis (96 Cases). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 53, n. 13, p. 413–415, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–18, set. 2004.

DIMRI, U.; RANJAN, R.; KUMAR, N.; SHARMA, M. C. Changes in oxidative stress indices, zinc and copper concentrations in blood in canine demodicosis. v. 154, p. 98–102, 2008.

ESCRIBANO, D.; TVARIJONAVICIUTE, A.; KOCATURK, M.; CERÓN, J. J.; PARDOMARÍN, L.; TORRECILLAS, A.; YILMAZ, Z.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Serum apolipoprotein-A1 as a possible biomarker for monitoring treatment of canine leishmaniasis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 49, p. 82–87, 2016.

FERREIRA, E. DE C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; SILVA, E. S. DA; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. F. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 3–4, p. 235–241, 2007.

FITZPATRICK, A.; AL-KOBAISI, N. S. M. S.; BEITMAN MAYA, J.; REN CHUNG, Y.; DUHAN, S.; ELBEGDORJ, E.; JAIN, S.; KUHN, E.; NASTASE, A.; AHMED, B. N.; OLLIARO, P. Sustaining visceral leishmaniasis elimination in Bangladesh – Could a policy brief help? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–11, 2017.

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

FREITAS, R. D. S.; CAMPOS, M. M. Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. **Nutrients**, v. 11, n. 945, p. 1–23, 2019.

GANGNEUX, J.; DULLIN, M.; SULAHIAN, A.; GARIN, Y. J.; DEROUIN, F. Experimental Evaluation of Second-Line Oral Treatments of Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 172–174, 1999.

GASPAROTTO, J.; KUNZLER, A.; SENGER, M. R.; FREITAS, S.; SIMONE, S. G. DE; BORTOLIN, R. C.; SOMENSI, N.; DAL-PIZZOL, F.; CLAUDIO, J.; MOREIRA, F.; ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, S.; SILVA-JR, F. P.; GELAIN, D. P. N -acetyl-cysteine inhibits liver oxidative stress markers in BALB / c mice infected with *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 146–154, 2017.

GAYKWAD, C.; GARKHAL, J.; CHETHAN, G. E.; NANDI, S.; DE, U. K. Amelioration of oxidative stress using N-acetylcysteine in canine parvoviral enteritis. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 1, p. 68–75, 2018.

GEISWEID, K.; MUELLER, R.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area. **Veterinary Record**, v. 171, p. 1–5, 2012.

GEISWEID, K.; MUELLER, R.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area. **Veterinary Record**, v. 171, n. 399, p. 1–6, 2016.

GÓMEZ-OCHOA, P.; CASTILLO, J. A.; GASCÓN, M.; ZARATE, J. J.; ALVAREZ, F.; COUTO, C. G. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 259–263, 2009.

GONÇALVES, R. D. S.; DE PINHO, F. A.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; AZEVEDO, R.; GAIFEM, J.; LARANGEIRA, D. F.; RAMOS-SANCHEZ, E. M.; GOTO, H.; SILVESTRE, R.; BARROUIN-MELO, S. M. Mathematical modelling using predictive biomarkers for the outcome of canine leishmaniasis upon chemotherapy. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 1–15, 2020.

GOTO, Y.; CHENG, J.; OMACHI, S.; MORIMOTO, A. **Prevalence, severity, and pathogenesis of anemia in visceral leishmaniasis** *Parasitology Research*, 2017.

GRIMALDI, G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PINTO, I. DE-S.; DE-AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. 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. 54–9, jan. 2012.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L.; VALENTINI, J.; PANIZ, C.; SCHMITT, G.; GARCIA, S. C.; POMBLUM, V. J.; ROCHA, J. B. T.; FARINA, M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 169–174, 2009.

GUEDES, M.; ESPERANÇA, A.; PEREIRA, A. C.; REGO, C. Qual o efeito da redução da hiperuricemia nos eventos cardiovasculares? Revisão baseada na evidência. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 33, n. 11, p. 727–732, 2014.

HAGEN, D. M.; EKENA, J. L.; GEESAMAN, B. M.; VIVIANO, K. R. Antioxidant supplementation during illness in dogs : effect on oxidative stress and outcome , a pilot study. **Journal os Small Animal Practice**, v. 60, p. 543–550, 2019.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.

HARVEY, J. W.; STEVENS, A.; LOWE, J. S.; SCOTT, I. **Veterinary Hematology**. [s.l.: s.n.].

HEIDARPOUR, M.; SOLTANI, S.; MOHRI, M.; KHOSHNEGAH, J. Canine visceral leishmaniasis : relationships between oxidative stress , liver and kidney variables , trace elements , and clinical status. p. 1491–1496, 2012.

KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. [s.l.] Academic Press, 2008.

KATO, K. C.; MORAIS-TEIXEIRA, E.; REIS, P. G.; SILVA-BARCELLOS, N. M.; SALAÜN, P.; CAMPOS, P. P.; CORRÊA-JUNIOR, J. D.; RABELLO, A.; DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: Possible role of residual sb(3) and protective effect of ascorbic acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 481–488, 2014.

KENNEDY, D. O. B vitamins and the brain: Mechanisms, dose and efficacy—A review. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 1–29, 2016.

KOENIG, G.; SENEFF, S. Gamma-Glutamyltransferase: A Predictive Biomarker of Cellular Antioxidant Inadequacy and Disease Risk. **Disease Markers**, v. 2015, p. 1–18, 2015.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527–538, 2014.

KRAWCZAK, F. DA S.; REIS, I. A.; DA SILVEIRA, J. A.; AVELAR, D. M.; MARCELINO, A. P.; WERNECK, G. L.; LABRUNA, M. B.; PAZ, G. F. *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: Co-infection or cross-reaction in serological methods? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 64–68, 2015.

KUMAR, G. A.; JAFURULLA, M.; CHATTOPADHYAY, A. The membrane as the gatekeeper of infection: Cholesterol in host–pathogen interaction. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 199, p. 179–185, 2016.

KWAK, S. M.; MYUNG, S. K.; LEE, Y. J.; SEO, H. G. Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: A meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. **Archives of Internal Medicine**, v. 172, n. 9, p. 686–694, 2012.

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G. VAN; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.

LATROFA, M. S.; DANTAS-TORRES, F.; CAPRARIIS, D. DE; CANTACESSI, C.; CAPELLI, G.; LIA, R. P.; BREITSCHWERDT, E. B.; OTRANTO, D. Vertical transmission of *Anaplasma platys* and *Leishmania infantum* in dogs during the first half of gestation. **Parasites & Vectors**, p. 1–6, 2016.

LENOX, C. E.; BAUER, J. E. Potential adverse effects of omega-3 fatty acids in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 2, p. 217–226, 2013.

LOMBARDI, P.; PALATUCCI, A. T.; GIOVAZZINO, A.; MASTELLONE, V.; RUGGIERO, G.; RUBINO, V.; MUSCO, N.; CRUPI, R.; CUTRIGNELLI, M. I.; BRITTI, D.; VASSALOTTI, G.; TERRAZZANO, G.; CORTESE, L. Clinical and immunological response in dogs naturally infected by *L. infantum* treated with a nutritional supplement. **Animals**, v. 9, n. 8, p. 1–14, 2019.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRÌ, A.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10–7, 28 fev. 2012.

LYRA, M. R. et al. Pancreatic toxicity as an adverse effect induced by meglumine antimoniate therapy in a clinical trial for cutaneous leishmaniasis. **Revista Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 58:68, n. 5, p. 1–6, 2016.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T.; FEITOSA, T.; PORFIRIO-PASSOS, G.; FARIAS, D.; ROBERTO, C.; BARROUIN-MELO, S. M. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis : Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 120–126, 2016.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L. DE; SENA, J. M. DE; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil : trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941–2947, 2008.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274–287, 20 dez. 2008.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Biomarkers Associated with *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1–18, 2018.

MANNA, L.; CORSO, R.; GALIERO, G.; CERRONE, A.; MUZZI, P.; GRAVINO, A. E. Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasites & Vectors**, v. 8:289, p. 1–9, 2015.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V. F.; MICHELE, P. L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A. E. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels

in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3–4, p. 271–280, 2006.

MANSON, J. E.; COOK, N. R.; LEE, I.; CHRISTEN, W.; BASSUK, S. S.; MORA, S.; GIBSON, H.; ALBERT, C. M.; GORDON, D.; COPELAND, T.; D'AGOSTINO, D.; FRIEDENBERG, G. Marine Omega-3 Fatty Acids and Prevention of Vascular Disease and Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 1, p. 23–32, 2019.

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

MARTINS, M. J.; ROQUE BRAVO, R.; ENEA, M.; CARMO, H.; CARVALHO, F.; BASTOS, M. DE L.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; DIAS DA SILVA, D. Ethanol addictively enhances the in vitro cardiotoxicity of cocaine through oxidative damage, energetic deregulation, and apoptosis. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 7, p. 2311–2325, 2018.

MASON, J. E.; STARKE, R. D.; VAN KIRK, J. E. Gamma-glutamyl transferase: A novel cardiovascular risk biomarker. **Preventive Cardiology**, v. 13, n. 1, p. 36–41, 2010.

MASTELLONE, V.; MUSCO, N.; VASSALOTTI, G.; PIANTEDOSI, D.; VASTOLO, A.; CUTRIGNELLI, M. I.; BRITTI, D.; CORTESE, L.; LOMBARDI, P. A nutritional supplement (Dilsh™) improves the inflammatory cytokines response, oxidative stress markers and clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Animals**, v. 10, n. 6, 2020.

MELÉNDEZ-LAZO, A.; ORDEIX, L.; PLANELLAS, M.; PASTOR, J.; SOLANO-GALLEGO, L. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. **Research in Veterinary Science**, v. 117, p. 18–27, 2018.

MIKKELSEN, K.; APOSTOLOPOULOS, V. B Vitamins and ageing. **Subcellular Biochemistry**, v. 90, p. 451–470, 2018.

MIRÓ, G.; GÁLVEZ, R.; FRAILE, C.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasites and Vectors**, v. 4, p. 1–7, 2011.

MIRÓ, G.; PETERSEN, C.; CARDOSO, L.; BOURDEAU, P.; BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; OLIVA, G. Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 718–730, 2017.

MOREIRA, V. R.; DE JESUS, L. C. L.; SOARES, R. E. P.; SILVA, L. D. M.; PINTO, B. A. S.; MELO, M. N.; DE ANDRADEPAES, A. M.; PEREIRA, S. R. F. Meglumine antimoniate (glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in Balb/c mice infected by *Leishmania (leishmania) infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1–27, 2017.

NASRI, H.; BARADARAN, A.; SHIRZAD, H.; KOPAEI, M. R. New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 5, n. 12, p. 1487–1499, 2014.

NERY, G.; BECERRA, D. R. D.; BORJA, L. S.; MAGALHÃES-JUNIOR, J. T.; SOUZA, B. M. P. S.; FRANKE, C. R.; VERAS, P. S. T.; LARANGEIRA, D. F.; BARROUIN-MELO, S. M. Avaliação da infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em

cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 701–707, 2017.

NERY, R. A.; KAHLOW, B. S.; SKARE, T. L.; TABUSHI, F. I. Ácido Úrico e Reparação Tecidual. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 28, n. 4, p. 290–292, 2015.

NESTEL, P.; CLIFTON, P.; COLQUHOUN, D.; NOAKES, M.; MORI, T. A.; SULLIVAN, D.; THOMAS, B. Indications for Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid in the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease. **Heart Lung and Circulation**, v. 24, n. 8, p. 769–779, 2015.

NICOLATO, R. D. C.; DE ABREU, R. T.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. D. O.; REIS, L. E. S.; CARVALHO, M. D. G.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; BOUILLET, L. E. M.; LEMOS, D. S.; COURA-VITAL, W.; BARBOSA REIS, A. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS ONE**, 2013.

NOGUEIRA, S.; AVINO, V. C.; GALVIS-OVALLOS, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; ANTONIO, M.; MOREIRA, B.; PAULA, A.; LOPES, P.; MOLLA, L. M.; MENZ, I. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12:79, p. 1–11, 2019.

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

NORMAN, F. F.; COMECHE, B.; CHAMORRO, S.; PÉREZ-MOLINA, J.-A.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Update on the major imported protozoan infections in travelers and migrants. **Future Microbiology**, v. 15, p. 213–225, 2020.

OSCARSSON, J.; HURT-CAMEJO, E. Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their mechanisms of action on apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans: A review. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2017.

PALTRINIERI, S. Oxidative stress and canine leishmaniasis : More than a simple consequence of host – parasite interaction. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 547–548, 2013.

PALTRINIERI, S.; GRADONI, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 552–578, 2016.

PALTRINIERI, S.; RAVICINI, S.; ROSSI, G.; ROURA, X. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Journal**, v. 186, n. 3, p. 393–395, 2010.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E. G.; MELRO, M. C. B. F.; OLIVEIRA, G. G. S.; DOS SANTOS, W. L. C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. **Acta Tropica**, v. 69, n. 1, p. 75–83, 1998.

PARODY, N.; CACHEIRO-LLAGUNO, C.; OSUNA, C.; RENSHAW-CALDERÓN, A.; ALONSO, C.; CARNÉS, J. Circulating immune complexes levels correlate with the progression of canine leishmaniosis in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.

274, n. April, p. 108921, 2019.

PENNISI, M. G.; DE MAJO, M.; MASUCCI, M.; BRITTI, D.; VITALE, F.; DEL MASO, R. Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. **Veterinary Record**, v. 156, n. 11, p. 346–349, 2005.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994.

PINTO, J. F. **Nutracêuticos e alimentos funcionais**. 1. ed. Lisboa: [s.n.].

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

PLUTA, A.; STRÓZECKI, P.; KĘSY, J.; LIS, K.; SULIKOWSKA, B.; ODROWAZ-SYPNIEWSKA, G.; MANITIUS, J. Beneficial effects of 6-month supplementation with omega-3 acids on selected inflammatory markers in patients with chronic kidney disease stages 1-3. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–7, 2017.

PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J.; BARRETT, M. P.; GARCI, R.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis : A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11(12): e0, p. 1–24, 2017.

RAHIMI NIYYAT, M.; AZIZZADEH, M.; KHOSHNEGAH, J. Effect of Supplementation With Omega-3 Fatty Acids, Magnesium, and Zinc on Canine Behavioral Disorders: Results of a Pilot Study. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 33, n. 4, p. 150–155, 2018.

RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; DA SILVA, M. E.; DOS SANTOS, C. C. P.; FRÉZARD, F. J. G.; DA SILVA, S. M. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 6, p. 1–12, 2018.

RIBEIRO, R. R.; MOURA, E. P.; PIMENTEL, V. M.; SAMPAIO, W. M.; SILVA, S. M.; SCHETTINI, D. A.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; TAFURI, W. L.; DEMICHELII, C.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; MICHALICK, M. S. M. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2564–2572, 2008.

RIBEIRO, V. M.; MAGNO, S.; SILVA, D.; MENZ, I.; TABANEZ, P.; DOS, F.; NOGUEIRA, S.; WERKHAÜSER, M.; LUIS, A.; DA FONSECA, S.; DANTAS-TORRES, F. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 1, 2013.

RIJAL, S. et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 11, p. 1530–1538, 2013.

RIZOS, E. C.; NTZANI, E. E.; BIKA, E.; MICHAEL S. KOSTAPANOS; ELISAF, M. S.; KOSTAPANOS, M. S. Association Between Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Risk of Major Cardiovascular Disease Events. **Journal of the American Medical Association**, v.

308, p. 1024–33, 2012.

RODRIGO, R.; GUICHARD, C.; CHARLES, R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 111–127, 2007.

RODRIGUES, M. L. O.; COSTA, R. S.; SOUZA, C. S.; FOSS, N. T.; ROSELINO, A. M. F. **Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 1999.

RODRÍGUEZ, N. E.; GAUR, U.; WILSON, M. E. Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1106–1120, 2006.

ROLÃO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O. R.; CAMPINO, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by Real-Time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction – enzyme-linked immunosorbent assay real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction – enzyme-linked i. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 1150–1154, 2004.

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

RUBIO, C. P.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; PARDO-MARIN, L.; SEGARRA, S.; CERON, J. J. Changes in serum biomarkers of oxidative stress after treatment for canine leishmaniosis in sick dogs. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 49, p. 51–57, 2016.

SANTIAGO, M. E. B.; NETO, L. S.; ALEXANDRE, E. C.; MUNARI, D. P.; ANDRADE, M. M. C.; SOMENZARI, M. A.; CIARLINI, P. C.; DE LIMA, V. M. F. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. **Acta Tropica**, v. 127, n. 3, p. 174–180, 2013.

SASANELLI, M.; PARADIES, P.; DE CAPRARIIS, D.; GRECO, B.; DE PALO, P.; PALMISANO, D.; CARELLI, G. Acute-phase proteins in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* during and after long-term therapy with allopurinol. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. SUPPL. 1, p. 335–338, 2007.

SCHNEIDER, C. D.; DE OLIVEIRA, A. R. Oxygen free radicals and exercise: Mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 314–318, 2004.

SEGARRA, S.; MIRÓ, G.; MONTOYA, A.; PARDO-MARÍN, L.; TEICHENNÉ, J.; FERRER, L.; CERÓN, J. J. Prevention of disease progression in *Leishmania infantum*-infected dogs with dietary nucleotides and active hexose correlated compound. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

SERARSLAN, G.; YILMAZ, H. R.; SÖĞÜT, S. Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 267–271, 2005.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 345–381, 2018.

SILVESTRE, R.; SANTARÉM, N.; CUNHA, J.; CARDOSO, L.; NIETO, J.; CARRILLO, E.; MORENO, J.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 23–30, 2008.

SILVESTRE, R.; TORRADO, E. **Metabolic Interaction in Infection**. Springer ed. [s.l.: s.n.].

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 438–463, 1991.

SINAN/DIVEP. Informe Epidemiológico de Leishmaniose Visceral (LV) - Bahia. **Diretoria de Vigilância Epidemiológica (DIVEP)**, n. 1, p. 4, 2018.

SMITH, C. E.; FREEMAN, L. M.; RUSH, J. E.; CUNNINGHAM, S. M.; BIOURGE, V. Omega-3 fatty acids in boxer dogs with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 2, p. 265–273, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, 28 out. 2009.

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

SOLCÀ, M. D. S.; BASTOS, L. A.; GUEDES, C. E. S.; BORDONI, M.; BORJA, L. S.; LARANGEIRA, D. F.; DA SILVA ESTRELA TUY, P. G.; AMORIM, L. D. A. F.; NASCIMENTO, E. G.; DE SÁ OLIVEIRA, G. G.; DOS-SANTOS, W. L. C.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Evaluating the Accuracy of Molecular Diagnostic Testing for Canine Visceral Leishmaniasis Using Latent Class Analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103635, 2014.

SOUZA, C. C.; BARRETO, T. D. O.; SILVA, S. M.; PINTO, A. W. J.; TAFURI, W. L.; FIGUEIREDO, M. M.; ROCHA, O. G. F.; CANGUSS, S. D. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. **Experimental Pathology**, v. 95, p. 260–270, 2014.

SRIVASTAVA, S.; MISHRA, J.; GUPTA, A. K.; SINGH, A.; SHANKAR, P.; SINGH, S. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2017.

SUPHIOGLU, C.; DE MEL, D.; KUMAR, L.; SADLI, N.; FREESTONE, D.; MICHALCZYK, A.; SINCLAIR, A.; ACKLAND, M. L. The omega-3 fatty acid, DHA, decreases neuronal cell death in association with altered zinc transport. **FEBS Letters**, v. 584, n. 3, p. 612–618, 2010.

THOMAS, J.; THOMAS, C. J.; RADCLIFFE, J.; ITSIOPOULOS, C. Omega-3 Fatty Acids in Early Prevention of Inflammatory Neurodegenerative Disease: A Focus on Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. [s.l.] Roca, 2014.

TOGHUEO, R. M. K. Anti-leishmanial and Anti-inflammatory Agents from Endophytes: A Review. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 9, n. 5, p. 311–328, 2019.

TORRECILHA, R. B. P.; UTSUNOMIYA, Y. T.; BOSCO, A. M.; ALMEIDA, B. F.; PEREIRA, P. P.; NARCISO, L. G.; PEREIRA, D. C. M.; BAPTISTIOLLI, L.; CALVO-BADO, L.; COURTENAY, O.; NUNES, C. M.; CIARLINI, P. C. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 132, p. 83–87, 2016.

TORRES, M.; BARDAGÍ, M.; ROURA, X.; ZANNA, G.; RAVERA, I.; FERRER, L. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Veterinary Journal**, v. 188, n. 3, p. 346–351, 2011.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 64, n. 3–4, p. 119–24, 2001.

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2018.

TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J. B.; MACHADO, J. G.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2–4, p. 118–123, 2009.

VALENZUELA, A.; VALENZUELA, R. Acidos grasos omega-3 en la nutrición ¿como aportarlos? **Revista Chilena de Nutricion**, v. 41, n. 2, p. 205–211, 2014.

VARGAS, D. A.; PRIETO, M. D.; MARTÍNEZ-VALENCIA, A. J.; COSSIO, A.; BURGESS, K. E. V.; BURCHMORE, R. J. S.; ADELAIDA GÓMEZ, M. Pharmacometabolomics of meglumine antimoniate in patients with cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. JUN, p. 1–11, 2019.

VITALE, G.; MOCCIARO, C.; GAMBINO, G.; SPINELLI, A.; GIORDANO, C.; STASSI, G. Evaluation of serum levels of soluble CD4, CD8 and B2-microglobulin in visceral human leishmaniasis. **Clinical and experimental Immunology**, v. 97, p. 280–283, 1994.

WEITZ, D.; WEINTRAUB, H.; FISHER, E.; SCHWARTZBARD, A. Z. Fish oil for the treatment of cardiovascular disease. **Cardiology in Review**, v. 18, n. 5, p. 258–263, 2010.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saude Publica**, v. 48, n. 5, p. 851–856, 2014.

WESTGARTH, S.; BLOIS, S. L.; D. WOOD, R.; VERBRUGGHE, A.; MA, D. W. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids and aspirin, alone and combined, on canine platelet function. **Journal of Small Animal Practice**, v. 59, n. 5, p. 272–280, 2018.

WHITFIELD, J. B. Gamma glutamyl transferase. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 38, n. 4, p. 263–355, 2001.

WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>.

ZAIDI, A.; SINGH, K. P.; ALI, V. *Leishmania* and its quest for iron: An update and overview. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 211, p. 15–25, 2017.

ZANDI, P. P.; ANTHONY, J. C.; KHACHATURIAN, A. S.; STONE, S. V.; GUSTAFSON, D.; TSCHANZ, J. A. T.; NORTON, M. C.; WELSH-BOHMER, K. A.; BREITNER, J. C. S. Reduced Risk of Alzheimer Disease in Users of Antioxidant Vitamin Supplements: The Cache County Study. **Archives of Neurology**, v. 61, n. 1, p. 82–88, 2004.

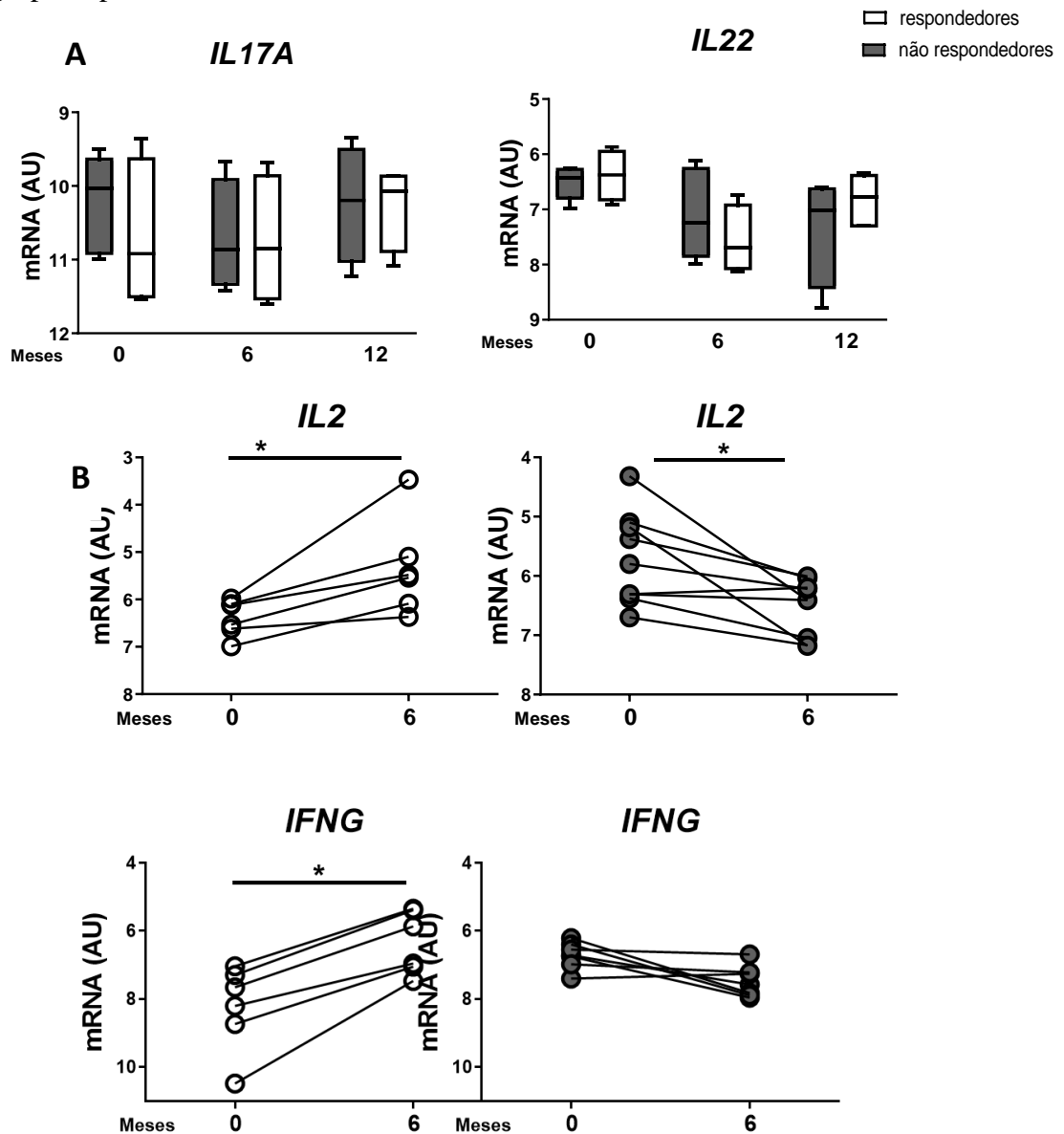
ZANETTE, M. F.; DE LIMA, V. M. F.; LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; VIEIRA, R. F. DA C.; BIONDO, A. W.; MARCONDES, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 105–107, 2014.

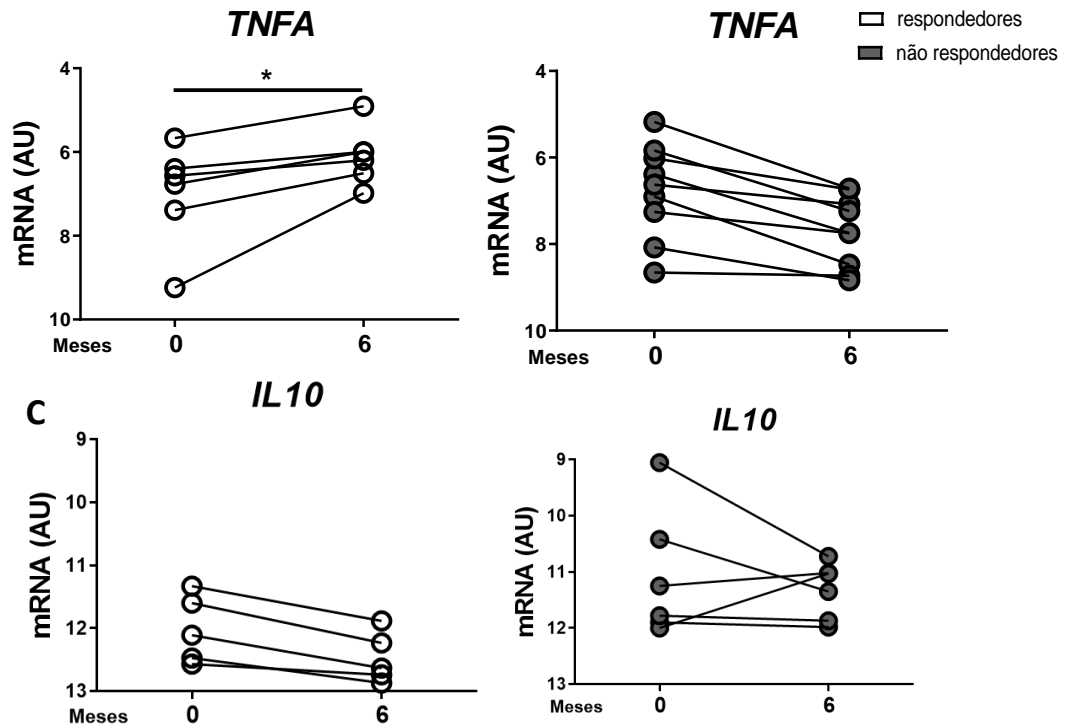
ZATELLI, A.; BORGARELLI, M.; SANTILLI, R.; BONFANTI, U.; NIGRISOLI, E.; ZANATTA, R.; TARDUCCI, A.; GUARRACI, A. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 5, p. 558–561, 2003.

## 6. APÊNDICE 1

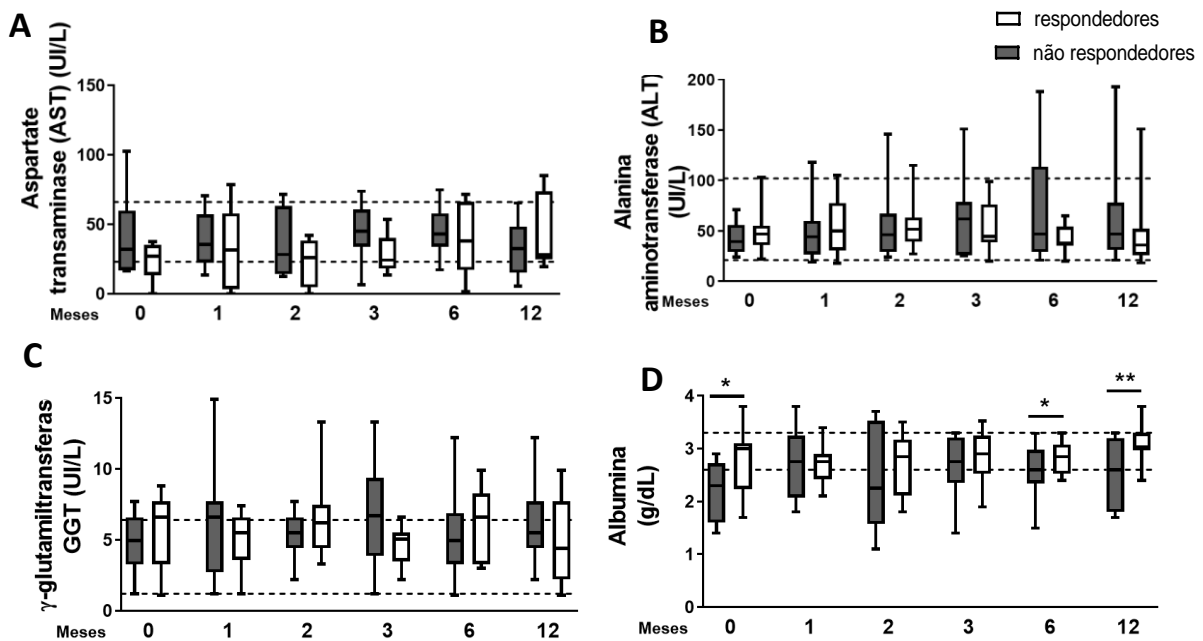
## Figuras suplementares do Capítulo I

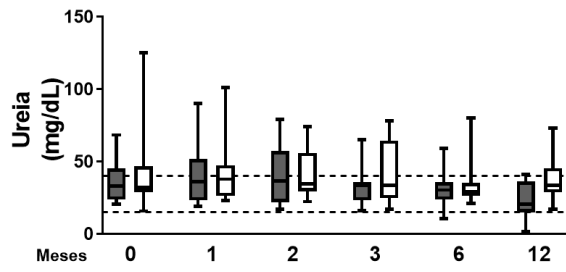
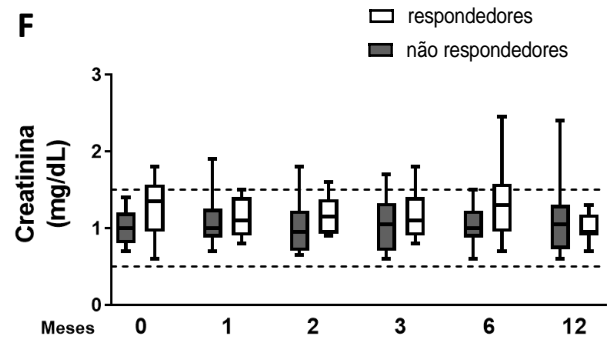
**Figura 1. O sucesso da quimioterapia anti-*Leishmania* é independente da resposta Th17. O mRNA foi isolado a partir de biópsias do baço em T0, T6 e T12. A PCR quantitativa foi realizada para IL17A e IL22 (A). Parcelas individuais para expressão de mRNA de IL2, IFNG e TNFA em T0 e T6 (B). Gráficos individuais para expressão de mRNA de IL-10 em T0 e T6 (C). Os dados são mostrados como média  $\pm$  DP ou em formato de caixa e bigode, n = 5 a 10 cães / grupo. \* p < 0,05.**





**Figura 2. Parâmetros hepáticos e renais no soro de cães que não respondem e que respondem.** Os valores séricos de aspartato transaminase (A), alanina aminotransferase (B), gamaglutamiltranspeptidase (C) e albumina (D) e ureia (E) e creatinina (F) foram quantificados em T0, T1, T2, T3, T6 e T12. Os dados são mostrados como média ± DP ou em formato de caixa e bigode, n = 12-14 cães / grupo. \* p <0,05; \*\* p <0,01.



**E****F**

## APÊNDICE 2

### Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) aprovada n. 19/2011

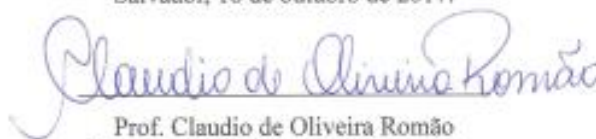
	UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
--	--	--

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudos sistêmicos sobre as leishmaniozes zoonóticas no Estado da Bahia**, registrada com o nº **19/2011**, sob a responsabilidade da **Professora Stella Maria Barrouin Melo**, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, **em reunião de 16/10/2017**.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	16/10/2017 a 16/10/2027
Espécie/linhagem/raça	Canina
Nº de animais	***
Peso/Idade	Variável
Sexo	Ambos
Origem	Domiciliados

Salvador, 16 de outubro de 2017.



Prof. Claudio de Oliveira Romão  
Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA

### APÊNDICE 3

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**HOSPITAL-ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente termo tem o objetivo de informar ao (a) guardião (ã) do animal quanto aos principais aspectos relacionados ao atendimento clínico no projeto “Estudos e Intervenção Terapêutica da Leishmaniose Visceral Canina”, sob cujas regras o cão será avaliado e tratado, complementando as informações prestadas pelo (a) seu (sua) médico (a) veterinário (a) e pela equipe de pesquisadores e médicos veterinários pertencentes ao projeto, no Hospital-Escola de Medicina Veterinária da UFBA (Equipe Atendimento LVC-HOSPMEV-UFBA).

Eu, \_\_\_\_\_, nascido em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_, portador do RG/CPF \_\_\_\_\_, declaro que fui devidamente informado (a) sobre o protocolo aplicado pela Equipe Atendimento LVC – HOSPMEV - UFBA, sendo o meu cão de nome \_\_\_\_\_, sexo \_\_\_\_\_, raça \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, submetido a triagem a partir da avaliação por meio de coleta de amostras de sangue, urina, aspirado esplênico, medula óssea e linfonodos pertencente ao projeto intitulado “Estudos e Intervenção Terapêutica da Leishmaniose Visceral Canina”. Parte das coletas dessas amostras serão mediante sedação, com o objetivo de tranquilizar o animal para a execução dos procedimentos.

Declaro estar ciente de que tanto os procedimentos de colheita de amostras quanto os medicamentos podem implicar riscos à saúde do meu animal, sob a forma de reações adversas ou reações idiossincrásicas (reações adversas ainda não descritas no cão) aos fármacos utilizados em qualquer etapa do diagnóstico ou tratamento, ou ainda de possibilidades de acidentes devido ao uso de instrumentos perfurantes, associados ou não ao próprio estado de saúde do cão portador de infecção por *Leishmania*. Estou ciente de que embora todos os riscos sejam possíveis, os métodos previstos no protocolo são de extrema importância para o tratamento adequado do animal e para impedir a transmissão da infecção. Todos os procedimentos serão realizados por médicos veterinários treinados, o que minimiza a possibilidade de ocorrências adversas.

Para participação deste cão no estudo, estou ciente de que é necessário seguir todas as prescrições realizadas pelos médicos veterinários e comunicar qualquer alteração manifestada pelo animal durante todo o período de tratamento. Caso na triagem seja confirmada a positividade de leishmaniose, o primeiro retorno será marcado em um período de 7 a 30 dias, no qual será iniciada a terapêutica anti-*Leishmania*. Depois disso, o animal retornará aos 30 dias, 40 dias, 60 dias, 90 dias, 180 dias, 270 dias e 365 dias após o primeiro dia de tratamento. Esse cronograma de retornos deve ser respeitado até o final do estudo. Declaro estar ciente de que a cada retorno serão realizados novos exames de rotina clínico-laboratorial e de que arcarei com os custos dos exames, pois o objetivo é acompanhar a eficiência do tratamento.

Confirmando que recebi explicações, li, compreendo e concordo com tudo que me foi esclarecido e que me foi concedida a oportunidade de anular, questionar, alterar qualquer espaço, parágrafo ou palavras com as quais não concordasse. Tive a oportunidade de fazer perguntas que me foram respondidas satisfatoriamente. Assim, tendo conhecimento, autorizo a realização do procedimento proposto em meu animal.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA À TESE

- 1) Co-autoria de artigo científico publicado na revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (fator de impacto: 2.983). DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113204

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 185 (2020) 113204



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)



### Detection of allopurinol and oxypurinol in canine urine by HPLC/MS-MS: Focus on veterinary clinical pharmacokinetics



Ana Leonor P.C. Godoy<sup>a</sup>, Clauceane de Jesus<sup>b</sup>, Rafaela S. Gonçalves<sup>b</sup>, Francine Johansson Azeredo<sup>c</sup>, Adriana Rocha<sup>d</sup>, Maria P. Marques<sup>d</sup>, Vera L. Lanchote<sup>d</sup>, Daniela F. Lorangeira<sup>b,e</sup>, Stella Maria Barrouin-Melo<sup>b,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia (UFBA), Rua Barão de Jeremoabo, 147, Salvador, BA, 40170-115, Brazil

<sup>b</sup> Teaching Hospital of Veterinary Medicine, UFBA, Av. Adhemar de Barros, 500, Salvador, BA, 40170-110, Brazil

<sup>c</sup> Department of Medicines, Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia (UFBA), Rua Barão de Jeremoabo, 147, Salvador, BA, 40170-115, Brazil

<sup>d</sup> Department of Clinical, Toxicological and Bromatological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida do Café, S/N, Ribeirão Preto, SP, 14040-903, Brazil

<sup>e</sup> Department of Veterinary Anatomy, Pathology and Clinics, School of Veterinary Medicine and Zootecny, UFBA, Salvador, BA, 40170-110, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 27 November 2019  
Received in revised form 20 February 2020  
Accepted 22 February 2020  
Available online 25 February 2020

**Keywords:**  
Validation  
Canine model  
Translational medicine  
Urinary analysis  
Leishmaniasis

#### ABSTRACT

Allopurinol is the most commonly used drug for the treatment of hyperuricemia in people, and in view of the risks of fatal hypersensitivity in patients with renal dysfunction, doses based on the glomerular filtration rate are proposed. In veterinary medicine, allopurinol is used in the treatment of canine leishmaniasis (CanL) caused by *Leishmania infantum* owing to the drug action of inhibiting the parasite's RNA synthesis. However, renal dysfunction frequently ensues from disease progression in dogs. The purpose of the present study was to standardize and validate a sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric (HPLC-MS/MS) method to determine the concentration of allopurinol and its active metabolite oxypurinol in canine urine for clinical pharmacokinetic investigation. Urine samples of eleven (11) dogs with naturally occurring CanL and in the maintenance phase of the treatment with allopurinol were used. For the chromatographic analysis of urine, the mobile phase consisted of a solution of 0.1 % formic acid (88 %) in 10 mM ammonium acetate. Separation of allopurinol and oxypurinol occurred in a flow of 0.8 mL/min on a C8 reverse phase column 5 μm, and acyclovir was the internal standard. The HPLC-MS/MS method was validated by reaching the limits of detection and quantification, reproducibility and linearity. The lower limit of quantification achieved by the method was 10 μg/mL for both allopurinol and oxypurinol. Calibration curves were prepared in blank urine added with allopurinol at concentrations of 10–1000 μg/mL, and oxypurinol at 10–200 μg/mL. Coefficients of variation of less than 15 % between intracurrent and intercurrent accuracy values were observed for both allopurinol and oxypurinol. Urine test samples remained stable after being subjected to freeze-thaw cycles and remaining at room temperature for 4 h. The method proved to be adequate to quantify allopurinol and oxypurinol in urine samples from dogs under treatment.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

2) Trabalho apresentado em forma de pôster no IV Congresso Internacional da Associação Portuguesa de Ciências Forenses (Porto-Portugal) em 2019

Link para acesso aos anais: <http://www.congresso2019.apcforenses.org/wp-content/uploads/2019/04/Flyer-Jornadas-2019.pdf>

(ISBN: 978-989-20-9295-9)

POSTER 29

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES METABÓLICOS DE STRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM NUTRACÊUTICOS**

Rafaela Gonçalves, Mariana Mendes, Tiago Andrade, Roseclea Santos, Mayro Carneiro, Flaviane Pinho, Daniela Larangeira, Ricardo Jorge Dinis-Oliveira, Ricardo Silvestre, Stella Barrouin-Melo

Copyright® 2019

ISBN edição online:  
ISBN 978-989-20-9295-9



9 789892 092959

1ª edição online: abril 2019

Paginação e designer gráfico: Ricardo Jorge Dinis-Oliveira

Capa: Joel Ribeiro

**IV Congresso Internacional da Associação Portuguesa de Ciências Forenses**

Este é o livro de resumos do APCF Congress 2019. Os resumos foram recebidos via submissão eletrónica on-line, compilados por tipo, e impressos como originalmente submetidos pelos autores, com breves edições de texto e formatação. O editor não assume nenhuma responsabilidade por erros ou omissões científicas, ou danos resultantes das informações aqui contidas. Este livro foi escrito ao abrigo do novo acordo ortográfico Português, tendo também sido aceites resumos submetidos em inglês, francês e espanhol. É permitida a reprodução dos textos publicados para fins não comerciais, desde que indicada a fonte.

**CITAÇÃO**

Autor do resumo. Título do Resumo, In *Livro de Resumos do IV Congresso Internacional da Associação Portuguesa de Ciências Forenses* (Dinis-Oliveira RJ Ed). Dinis-Oliveira RJ, páginas, Lisboa, 2019. ISBN 978-989-20-9295-9

**AGRADECIMENTO**

O editor agradece ao Instituto Universitário de Ciências da Saúde, à Associação Portuguesa de Ciências Forenses e aos autores dos resumos que contribuíram cientificamente.

3) Trabalho apresentado em forma de pôster no 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (2018). Link para acesso aos anais:

<http://www.adaltech.com.br/anais/medtrop2018/arquivos/todos%20os%20trabalhos.pdf>

#### **AValiação DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* sp.**

**Autores** Rafaela de Sousa Gonçalves <sup>1</sup>, Roseclea Chagas dos Santos <sup>1</sup>, Íris Daniela Santos de Meneses <sup>2</sup>, Tiago Sena de Andrade <sup>1</sup>, Mariana Oliveira Mendes <sup>1</sup>, Clauceane de Jesus <sup>1</sup>, Daniela Farias Larangeira <sup>1</sup>, Flaviane Alves de Pinho <sup>1</sup>, Stella Maria Barrouin-Melo <sup>1</sup>

**Instituição** <sup>1</sup> LIVE-HOSPMEV-UFBA - Laboratório de Infectologia Veterinária, Hospital de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia (Av. Adhemar de Barros 500, Salvador, Bahia, Brasil. CEP: 40170-110.), <sup>2</sup> LAC-HOSPMEV-UFBA - Laboratório de Análises Clínicas, Hospital de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia (Av. Adhemar de Barros 500, Salvador, Bahia, Brasil. CEP: 40170-110.)

#### **Resumo**

A leishmaniose visceral causada por *Leishmania infantum* é uma doença parasitária crônica de importância médico-veterinária e na Saúde Única. O tecido medular ósseo é um sítio preferencial de proliferação de *L. infantum* e sua avaliação pode contribuir para definição de um prognóstico clínico na leishmaniose visceral canina (LVC). Assim, o objetivo do presente estudo foi descrever as alterações citopatológicas da medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Vinte cães com infecção por *L. infantum* confirmada PCR qualitativa de aspirados esplênicos, atendidos no Hospital-Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, provenientes de diversas áreas endêmicas no estado da Bahia, foram incluídos no estudo. Nenhum dos cães havia recebido tratamento prévio para a doença. Amostras de medula óssea foram obtidas para a realização do mielograma e avaliação do estoque de ferro. No mielograma, observou-se que 80% (16/20) dos cães infectados tinham formas amastigotas de *Leishmania* sp., extra e intracelularmente, na medula óssea, enquanto 20% (4/20) não apresentavam amastigotas ao exame citológico da medula. Dentre as alterações observadas nas linhagens eritroide, mieloide e megacariocítica, as mais frequentes foram hipoplasia da série eritroide em 50% (10/20) dos casos, hiperplasia da série mieloide em 35% (7/20) e hipoplasia da série megacariocítica em 15% (3/20). A maioria dos cães infectados apresentava estoque de ferro medular adequado (69%, 11/16). Os cães cujo diagnóstico citológico medular foi negativo na pesquisa de amastigotas de *Leishmania*, apresentaram medula óssea sem qualquer

alteração, portanto, citologicamente normal (20%, 4/20). Dessa forma, hipotetizamos que a multiplicação e persistência crônica do protozoário no tecido hematopoiético medular foi o fator que gerou desorganização medular, origem da anemia tão consistentemente associada à LVC, e relatada na literatura especializada em medicina veterinária. Concluímos que a hipoplasia eritroide foi o achado mais frequente no mielograma de cães infectados por *L. infantum*, e que a análise do tecido medular agrega informações importantes para o manejo do paciente e prognóstico da enfermidade. A medula óssea na LVC é objeto de estudo pelo grupo Infectologia Veterinária – CNPq.

**Palavras-chaves:** hipoplasia eritroide, leishmaniose, mielograma

4) Trabalho apresentado em forma de pôster no 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (2019) por orientandos de Iniciação Científica sob tutoria de Rafaela de Sousa Gonçalves PIBIC/UFBA: Mariana Mendes e Tiago Andrade. Link para acesso aos anais: <https://www.medtrop-parasito2019.com.br/anais/divisao/aprovados>

ISBN: 978-55-81747-00-8



## ANAIS CONGRESSO MEDTROP-PARASITO 2019

### **Estadiamento dos cães naturalmente infectados por *L. Infantum* atendidos no Ambulatório de Leishmanioses Zoonóticas do Hospital-Escola de Veterinária da UFBA**

**Autor(es):** Mariana Oliveira Mendes, Tiago Sena de Andrade<sup>1</sup>, Rafaela de Sousa Gonçalves<sup>1</sup>, Roseclea Chagas dos Santos<sup>1</sup>, Flaviane Alves de Pinho<sup>1</sup>, Daniela Farias Lorangeira<sup>1</sup>, Stella Maria Barrouin-Melo<sup>1</sup>

**Instituição(es):** <sup>1</sup>Universidade Federal da Bahia

A leishmaniose canina (LCan) é uma doença sistêmica causada pela *Leishmania infantum* no Brasil e pode ter apresentação clínica bastante diversificada. A ocorrência de quadros clínicos inespecíficos ou mesmo infecção subclínica fazem com que o diagnóstico da LCan represente um desafio para o médico veterinário clínico. O estudo teve o objetivo de descrever a apresentação clínica da doença em cães naturalmente infectados para caracterizar sinais predominantes de LCan na Bahia, e foi conduzido entre agosto/2017 e agosto/2018. Foram atendidos 90 cães no Ambulatório de Leishmanioses Zoonóticas, no Hospital-Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, em Salvador, dos quais 32 (35,6%) foram positivos na detecção de DNA de *L. infantum* por PCR. Esses 32 cães foram estadiados conforme o protocolo do grupo Leishvet-Europa, que determina quatro estadios segundo a gravidade da doença. A análise dos sinais clínicos e exames laboratoriais resultou na seguinte distribuição: cinco cães (5/32; 15,6%) foram classificados no estadio I; 21 (21/32; 62,5%) no estadio II; dois cães (2/32; 6,3%) no estadio III; e quatro no estadio IV (4/32) representando 12,5% do total. Os sinais clínicos mais comuns foram, em ordem de frequência, dermatopatias (27/32), linfadenomegalia (25/32) e emagrecimento (11/32). As alterações mais encontradas nos exames de patologia clínica foram hiperglobulinemia (21/32), anemia (21/32) e hipoalbuminemia (16/32). A maioria dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentou, portanto, LCan classificada nos estadios I ou II (26/32; 81,2%), o que pode indicar que os guardiões têm procurado o serviço médico-veterinário especializado precocemente. Os cães em estadio III e IV apresentaram nefropatias em variados graus. Não houve infecção subclínica, o que é esperado por se tratar de uma população de cães atendidos em serviço veterinário. A distribuição encontrada equivale às descrições da apresentação de LCan por *L. infantum* reportadas em outras regiões endêmicas do Brasil e do

5) Trabalho apresentado em forma de pôster no 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (2019). Link para acesso aos anais: <https://www.medtrop-parasito2019.com.br/anais/divisao/aprovados>

ISBN: 978-55-81747-00-8

**Levantamento dos métodos de diagnóstico de leishmaniose canina dos casos atendidos no Hospital-Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**

**Autor(es):** Cosme Nogueira da Silva<sup>1</sup>, Thamires Carvalho da Luz<sup>1</sup>, Caio de Almeida Souza Seixas<sup>1</sup>, Leonardo Ribas Pacheco<sup>1</sup>, Rafaela de Sousa Gonçalves<sup>1</sup>, Daniela Farias Laranjeira<sup>2</sup>, Stella Maria Barrouin-Melo<sup>2</sup>, Flaviane Alves de Píngo<sup>2</sup>

**Instituição(es):** <sup>1</sup>UFBA - Universidade Federal da Bahia, <sup>2</sup>Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas Veterinária

A leishmaniose canina (LCan) é uma doença crônica e progressiva causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e caracterizada por uma variedade de sinais clínicos similares a outras doenças. Dessa forma, a infecção por *L. infantum* no cão é confirmada com o diagnóstico laboratorial. Os testes sorológicos são amplamente utilizados e recomendados pelas autoridades públicas para a confirmação da doença. No entanto, os resultados dos testes sorológicos são controversos em diferentes regiões brasileiras, o que tem estimulado a escolha dos métodos parasitológicos ou moleculares na rotina da medicina veterinária para confirmar a infecção e, por conseguinte, adotar a conduta terapêutica mais adequada. Assim, foi avaliado o desempenho de técnicas diagnósticas sorológicas RIFI e ELISA para confirmação da LCan em comparação aos testes de referência citologia/PCR utilizando aspirado de medula óssea, baço e/ou linfonodo, em 204 cães atendidos no HOSPMEV-UFBA, no período de Janeiro de 2016 à Agosto de 2018. Os índices de positividade para os testes RIFI e ELISA, foram de 72,05%(49/68) e 65,58% (101/154), respectivamente. Na análise comparativa do desempenho das técnicas sorológicas com os testes de referência, os resultados entre a RIFI e a citologia/PCR revelou uma concordância moderada de 0,412 com valores de sensibilidade e especificidade de 77,78% e 100% respectivamente, e acurácia de 80%. O teste ELISA revelou resultados superiores ao RIFI com uma

6) Trabalho apresentado em forma de pôster no 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (2019). Link para acesso aos anais: <https://www.medtrop-parasito2019.com.br/anais/divisao/aprovados>

ISBN: 978-55-81747-00-8



## ANAIS CONGRESSO MEDTROP-PARASITO 2019

### Ocorrência de infecção por *Leishmania infantum* em felino (*Felis catus*) no Recôncavo Baiano

**Autor(es):** Catharina Ribeiro de Farias, Nara Santos dos Santos<sup>1</sup>, Bruno Milen Varjão<sup>1</sup>, Natasha Milen Varjão<sup>1</sup>, Catharina Ribeiro de Farias<sup>1</sup>, Rafaela de Sousa Gonçalves<sup>1</sup>, Marina Santanna Rossi Peixoto<sup>1</sup>, Talyta Lins Nunes<sup>1</sup>, Nádia Rossi de Almeida<sup>1</sup>, Flaviane Alves de Pinho<sup>1</sup>, Stella Maria Barrouin-Melo<sup>1</sup>

**Instituição(es):** <sup>1</sup>Universidade Federal da Bahia

A leishmaniose visceral é uma zoonose endêmica em regiões tropicais e subtropicais, que acomete principalmente cães e humanos e é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* nas Américas. Apesar do cão ser o hospedeiro mamífero mais susceptível à infecção por *L. infantum* e contribuir sobremaneira na cadeia epidemiológica da doença, há evidências de que outros mamíferos são infectados por esse parasito, dentre eles o gato. Estados brasileiros como a Bahia são endêmicos para leishmaniose visceral humana e canina, mas sem registros científicos da ocorrência da leishmaniose felina. Assim, a proposta deste estudo foi investigar a ocorrência da infecção em gatos domésticos por *L. infantum* em municípios do recôncavo baiano, em áreas que já têm cães infectados e doentes, através do estudo de corte transversal. O estudo foi conduzido por busca ativa por meio de visitas a domicílios e abrigos de felinos domésticos. Os gatos foram submetidos a exame físico e colheita de amostras de medula óssea para diagnóstico molecular pela técnica PCR. Dos 27 gatos avaliados, apenas 3,7% (1/27) revelou positividade para infecção por *L. infantum*. O gato positivo era macho, sem raça definida e convivia com dois cães com leishmaniose. A avaliação clínica desse gato infectado não evidenciou sinais clínicos sugestivos de doença. O exame hematológico revelou apenas uma neutropenia discreta na contagem diferencial de leucócitos. Os gatos são considerados hospedeiros mamíferos resistentes à infecção por *Leishmania*. No entanto, quando co-infectados por outros agentes infecciosos podem tornar-se susceptíveis e desenvolver infecção ativa e doença, tornando-se potenciais transmissores do parasito aos vetores. Assim, a identificação e caracterização de gatos domésticos infectados por *Leishmania* sp. é importante para se conhecer o seu papel no ciclo epidemiológico da leishmaniose, além de esclarecer a importância da enfermidade felina para a medicina veterinária.

7) Trabalhos apresentados em forma oral no Congresso UFBA (2019). Link para acesso aos anais: [https://proext.ufba.br/sites/proext.ufba.br/files/congresso-ufba-2019\\_caderno-resumos.pdf](https://proext.ufba.br/sites/proext.ufba.br/files/congresso-ufba-2019_caderno-resumos.pdf)

## TRABALHO: SUPORTE NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA AO HOSPITAL-ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

**Autor(es):** CAIO DE ALMEIDA SOUZA SEIXAS, THAMIRES CARVALHO LUZ, COSME NOGUEIRA DA SILVA, NARA SANTOS DOS SANTOS, BRUNO MILEN VARJÃO, RAFAELA DE SOUSA GONÇALVES, Daniela Farias Lorangeira, Stella Barrouin, Flaviane Alves Pinho

**Resumo:** A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de importância na Saúde Única, e endêmica em vários estados brasileiros. A Bahia é um estado brasileiro com alta prevalência (com registros variando de 20% a 52%) para leishmaniose canina (LCan) em seus municípios. Dessa forma, o objetivo dessa proposta é prestar serviço de diagnóstico para LCan nos cães atendidos no Hospital-Escola de Medicina Veterinária da UFBA (HOSPMEV-UFBA) residentes em áreas endêmicas da região metropolitana de Salvador-Bahia. Para tanto, é realizado na rotina do HOSPMEV-UFBA o diagnóstico parasitológico (citologia e cultivo) e molecular, em amostras biológicas de cães com suspeita clínica para LCan. No período de abril/2018 a maio/2019, foram atendidos 103 cães com suspeita clínica para LVC (casos novos), 33% (34/103) desses cães foram positivos nos testes parasitológico e/ou molecular. Dentre os 97 animais submetidos ao exame molecular, foi detectado DNA de *Leishmania* sp por PCR em 31,96% (31/97). No cultivo foram isoladas formas promastigotas de *Leishmania* sp em apenas 31,81% (7/22) dos cães. Já na citologia, foram visibilizadas formas amastigotas de *Leishmania* sp em 42,85% (3/7) das amostras. Dentre os métodos de diagnóstico o molecular mostrou-se mais sensível, o que justifica ser o mais utilizado na rotina. No referido período, o projeto foi estruturado em ações divididas em dois eixos: (1) eixo assistencial voltado para a orientação dos guardiões no Ambulatório de Leishmanioses Zoonóticas do HOSPMEV-UFBA, a partir da forma dialógica e de materiais educativos em formato de cartilhas e a criação de vídeos; (2) sistematização do conhecimento, no qual, os acadêmicos da graduação e pós-graduação foram treinados para a realização dos testes diagnósticos para LCan, e orientados na organização de estudos na temática nas reuniões científicas semanais e na elaboração de resumos e/ou artigos científicos para

8) Trabalho apresentado em forma oral no Congresso UFBA (2019). Link para acesso aos anais: [https://proext.ufba.br/sites/proext.ufba.br/files/congresso-ufba-2019\\_caderno-resumos.pdf](https://proext.ufba.br/sites/proext.ufba.br/files/congresso-ufba-2019_caderno-resumos.pdf)

**Area:** CIÊNCIAS AGRÁRIAS - MEDICINA  
VETERINÁRIA

**TRABALHO: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O  
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR  
DE LEISHMANIOSE CANINA NO HOSPITAL-  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA DA  
UFBA**

**Autor(es):** COSME NOGUEIRA DA SILVA, BRUNO MILEN  
VARJÃO, RAFAELA DE SOUSA GONÇALVES, Daniela Farias  
Larangeira, MANUELA DA SILVA SOLCÁ, Stella Barrouin,  
Flaviane Alves Pinho

**Resumo:** A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo um grave problema de saúde pública no mundo. No Brasil, o cão é um hospedeiro mamífero suscetível a infecção por *Leishmania infantum*, e considerado o principal reservatório doméstico do agente no ambiente urbano e periurbano. O Ministério da Saúde indica o teste sorológico ELISA como método confirmatório da leishmaniose canina (LCan), cuja sensibilidade e especificidade são variáveis em diferentes regiões brasileiras. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi desenvolver um algoritmo para o diagnóstico de LCan para o Ambulatório de Leishmanioses Zoonóticas do Hospital-Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEV-UFBA), com base nas ferramentas diagnósticas sorológicas e moleculares disponíveis na rotina do atendimento médico veterinário. Para tanto, foi realizado um levantamento de 100 prontuários referentes aos cães com suspeita clínica para LCan atendidos durante o período de Janeiro de 2016 a Agosto de 2018, que foram diagnosticados pelos métodos sorológicos (RIFI e ELISA) e/ou moleculares (PCR). A técnica PCR foi considerada como método de referência para o diagnóstico da LCan. Os índices de positividade para os testes RIFI e ELISA, foram de 65,63% (21/32) e 55,58% (43/77), respectivamente. Na análise comparativa do desempenho das técnicas sorológicas com o teste de referência, os resultados entre a RIFI e a PCR revelou uma concordância moderada de 0,4 com valores de sensibilidade e especificidade de 76% e 80% respectivamente, e acurácia de 77%. O teste ELISA revelou resultados superiores ao RIFI com uma concordância quase perfeita de 0,592 com 85,11% de sensibilidade e 83,33% de especificidade, e uma acurácia de 84,75%. O teste PCR foi capaz de detectar 43,47% (10/23) dos cães soronegativos. Dessa forma, sugerimos a realização da PCR para diagnóstico da LCan dos cães doentes e soronegativos que residem em áreas endêmicas para leishmaniose.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose canina, Diagnóstico, Zoonose


\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*

9) Trabalho apresentado em forma oral no Congresso UFBA (2018) por orientandos de Iniciação Científica sob tutoria de Rafaela de Sousa Gonçalves PIBIC/UFBA: Mariana Mendes, Tiago Andrade e Mayro Rafaga. Link para acesso aos anais: [http://www.congresso2018.ufba.br/wp-content/uploads/congresso-ufba-2018\\_caderno-resumos1.pdf](http://www.congresso2018.ufba.br/wp-content/uploads/congresso-ufba-2018_caderno-resumos1.pdf)

**Area:** CIÊNCIAS AGRÁRIAS - MEDICINA  
VETERINÁRIA

### **TRABALHO: AVALIAÇÃO CLÍNICA DE CÃES PORTADORES DE LEISHMANIOSE VISCERAL E COMORBIDADES POR OUTRAS INFECÇÕES**

**Autor(es):** TIAGO ANDRADE, MAYRO RAFAGA LOPES  
CARNEIRO, RAFAELA DE SOUSA GONÇALVES, MARIANA  
OLIVEIRA MENDES, Stella Barrouin, ROSECLEA CHAGAS DOS  
SANTOS, Daniela Farias Larangeira, Flaviane Alves Pinho

46  Congresso da UFBA 2018 | Caderno de resumos

**Resumo:** A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose que tem um grande impacto na saúde pública e na saúde dos cães, cujos os sinais clínicos e alterações laboratoriais variam conforme intensidade parasitária no organismo e susceptibilidade do hospedeiro. A apresentação clínica muitas vezes cursa com sinais inespecíficos como emagrecimento progressivo, linfadenomegalia, apatia dificultado o diagnóstico. As coinfeções hemoparasitárias têm impacto direto na saúde dos caninos, além de causarem sinais clínicos semelhantes à LVC. Neste estudo, 46 cães com diagnóstico molecular positivo pela reação da cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA de *Leishmania infantum* foram submetidos também à PCR para detecção de DNA de *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e *Hepatozoon canis*. Foi realizado o levantamento das alterações clínicas e laboratoriais presentes nos cães no momento da triagem. Para isso utilizou-se uma ficha padrão de atendimento clínico onde foram assinaladas as ocorrências de oftalmopatias, dermatopatias, neuropatias, emagrecimento, avaliação de mucosas, linfonodos, presença de epistaxe, diarreia, nódulos subcutâneos e apatia. Para avaliação laboratorial, foram solicitados hemograma, leucograma, contagem de reticulócitos, proteínas totais, albumina, globulina, fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), ureia, creatinina, urinálise e a relação proteína creatinina (UPC). Os dados foram tabulados, agrupados de forma ordenada e analisados por estatística descritiva, para estabelecer as frequências das principais alterações encontradas. Dentre os cães positivos para LVC (44,2%, 46/104), 21,7% (10/46) apresentaram resultado positivo para DNA de *E. canis* e 10,9% (5/46) apresentaram resultado positivo para DNA de *B. canis*, um dos caninos apresentou resultado positivo para DNA de *E. canis* e *B. canis* e nenhum dos animais apresentou resultado positivo para DNA de *H. canis*. Este estudo relata as principais alterações tegumentares, viscerais e laboratoriais encontradas nos cães com LVC e comorbidades atendidos pelo Laboratório de Infectologia Veterinária do Hospital-Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

**Palavras-chaves:** Cães, Coinfeções, Leishmaniose Canina

10) Trabalho apresentado em forma oral no Congresso UFBA (2018) por orientandos de Iniciação Científica sob tutoria de Rafaela de Sousa Gonçalves PIBIC/UFBA: Mariana Mendes, Tiago Andrade e Mayro Rafaga. Link para acesso aos anais: [http://www.congresso2018.ufba.br/wp-content/uploads/congresso-ufba-2018\\_caderno-resumos1.pdf](http://www.congresso2018.ufba.br/wp-content/uploads/congresso-ufba-2018_caderno-resumos1.pdf)

**Area:** CIÊNCIAS AGRÁRIAS - MEDICINA  
VETERINÁRIA

**TRABALHO: DIAGNÓSTICO MOLECULAR  
DE EHRlichIA SPP. E BABESIA SPP. EM  
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL  
NATURALMENTE ADQUIRIDA**

**Autor(es):** MARIANA OLIVEIRA MENDES, RAFAELA DE SOUSA GONÇALVES, ROSECLEA CHAGAS DOS SANTOS, MAYRO RAFAGA LOPES CARNEIRO, TIAGO ANDRADE, Flaviane Alves Pinho, Daniela Farias Larangeira, Stella Barrouin

**Resumo:** A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose potencialmente fatal, endêmica e negligenciada que acomete principalmente cães domésticos e humanos, sendo a *Leishmania infantum* o agente etiológico de maior importância no Brasil. Em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, a ocorrência concomitante de outras infecções de transmissão vetorial tem sido associada à maior frequência e gravidade de sinais clínicos e aumento da carga parasitária de *Leishmania*. O objetivo deste estudo foi diagnosticar coinfeções por *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em cães com leishmaniose visceral naturalmente adquirida. Foram estudados 104 cães domiciliados em municípios endêmicos da Bahia, atendidos no fluxo de rotina do Ambulatório de Leishmanioses Zoonóticas do

Hospital-Escola de Medicina Veterinária da UFBA (Salvador), com suspeita clínica e/ou soropositivos em testes de triagem para LV, encaminhados por médicos veterinários de clínicas privadas. Amostras de aspirado esplênico desses cães foram submetidas à extração de DNA e análise pela reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativa utilizando primers RV1/RV2 específicos para *L. infantum*. Amostras de sangue periférico dos cães com infecção confirmada por *L. infantum* foram analisadas por nested-PCR para detecção da porção do gene 16s do RNA ribossômico de *E. canis*, e por PCR qualitativa para identificação da porção 18S do rRNA de *B. canis*. O DNA de *L. infantum* foi detectado em um total de 47 cães (45,1%; 47/104), dos quais 31,9% (15/47) foram também positivos para DNA de *E. canis* (21,2%; 10/47) e *B. canis* (10,6%; 5/47). Houve maior frequência de coinfeções *L. infantum*-*E. canis* (66,6%; 10/15) nos cães estudados, em comparação com as coinfeções *L. infantum*-*B. canis*, que ocorreram em 33,3% (5/15). Apenas um cão coinfectado (1/15; 6,7%) apresentou a infecção tripla *L. infantum*-*E. canis*-*B. canis*. Estudos são necessários para a maior compreensão dos efeitos do sinergismo desses patógenos sobre o sistema imune do cão, uma vez que as comorbidades, além de agravarem os sinais clínicos da LV canina, favorecem maior replicação da *L. infantum*, consequentemente maior risco de transmissão a outros cães e humanos. Nossos dados demonstram a ocorrência de coinfeções em áreas endêmicas e evidenciam a necessidade de investigar fármacos e protocolos terapêuticos adequados a cães, que assim contribuam para melhor controle da leishmaniose zoonótica nas áreas endêmicas do Brasil.

**Palavras-chaves:** hemoparasitose, *Leishmania*, PCR

\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*

11) Trabalho apresentado em forma oral no Congresso UFBA (2018) por orientandos de Iniciação Científica sob tutoria de Rafaela de Sousa Gonçalves PIBIC/UFBA: Mariana Mendes, Tiago Andrade e Mayro Rafaga. Link para acesso aos anais: [http://www.congresso2018.ufba.br/wp-content/uploads/congresso-ufba-2018\\_caderno-resumos1.pdf](http://www.congresso2018.ufba.br/wp-content/uploads/congresso-ufba-2018_caderno-resumos1.pdf)

## TRABALHO: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEPATOOZON SPP. EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE ADQUIRIDA

**Autor(es):** MAYRO RAFAGA LOPES CARNEIRO, Stella Barrouin, Daniela Farias Larangeira, Flaviane Alves Pinho, RAFAELA DE SOUSA GONÇALVES, ROSECLEA CHAGAS DOS SANTOS, MARIANA OLIVEIRA MENDES, TIAGO ANDRADE

**Resumo:** A leishmaniose visceral canina (LVC), causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, é uma importante zoonose potencialmente fatal para os cães. Coinfecções com organismos de transmissão vetorial podem afetar a gravidade da LVC, favorecendo a manifestação de sinais clínicos e/ou anormalidades clinicopatológicas. Descrições de coinfecção entre *L. infantum* e *Hepatozoon canis* ainda são limitadas no Brasil. Relatos de cães coinfectados com *Leishmania sp.* e *Hepatozoon canis* foram mencionados em Mato Grosso, Rio Grande do Norte e Pernambuco até o momento. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar casos da coinfecção por *H. canis* em um grupo de cães portadores de infecção natural por *L. infantum* oriundos de área endêmica para essa enfermidade. Para tal, foram analisadas amostras de sangue de cinquenta cães atendidos no Ambulatório de Leishmanioses Zoonóticas do Hospital-Escola de Medicina Veterinária (HOSPMEV) da Universidade Federal da Bahia, ambos os sexos com idade superior a oito meses naturalmente infectados por *L. infantum*. Essas amostras foram submetidas a extração do DNA com kits comerciais e as reações em cadeia da polimerase (PCR) desenvolvidas com primers para *H. canis* para diagnóstico da coinfecção, no Laboratório de Infectologia Veterinária do HOSPMEV-UFBA.

Nenhuma das amostras (0/50) apresentou positividade para a comorbidade, o que permite sugerir que os cães dessa área geográfica não foram expostos ao *H. canis*. Como não podemos excluir a possibilidade da existência do *H. canis*, haja vista comunicações pessoais no meio veterinário sobre casos diagnosticados nessa área, hipotetizamos que alguns de nossos resultados negativos podem até mesmo ser atribuídos ao tratamento à base de fármacos antimicrobianos, instituído contra outras hemoparasitoses comumente endêmicas na localidade, como ehrlichiose e babesiose, que pode ter controlado também esse hemoprotozoário. Nossos estudos basearam-se na detecção de material genético, portanto, estudos sorológicos para detecção de imunoglobulinas G contra *H. canis* devem ser feitos em amostras sanguíneas para investigação de resposta imune indicadora de possível circulação desse parasito nas áreas endêmicas para leishmaniose visceral.

**Palavras-chaves:** PCR, Leishmaniose visceral canina, Hepatozoonose canina, Coinfecções

\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*