



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A  
ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL

LUANA DIAS DE MOURA

**Alterações renais de cães infectados por *Leishmania infantum* tratados com  
alopurinol e imunoterapia**

TERESINA/PI

2023

LUANA DIAS DE MOURA

**Alterações renais de cães infectados por *Leishmania infantum* tratados com alopurinol e imunoterapia**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional/Universidade Federal do Piauí para cumprimento de defesa do Doutorado em Medicina Veterinária.

**Área de Concentração:** Medicina Veterinária  
**Linha de Pesquisa:** Diagnóstico e Terapêutica em Medicina Veterinária

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz

TERESINA/PI

2023

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial CCA  
Serviço de Representação da Informação

M929a Moura, Luana Dias de.  
Alterações renais de cães infectados por *Leishmania infantum*  
tratados com alopurinol e imunoterapia / Luana Dias de Moura.  
-- 2023.  
115 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de  
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias  
Aplicadas a Animais de Interesse Regional - Teresina, 2023.

“Orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz .”

1. Cão. 2. Calazar. 3. Imunoterapia. 4. Doença renal. I.  
Cruz, Maria do Socorro Pires e. II. Título.

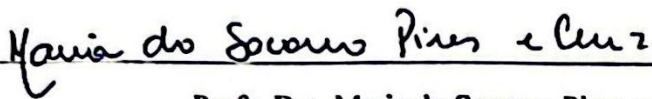
CDD 636.089

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa -  
CRB3/1163

Alterações renais de cães infectados por *Leishmania infantum* tratados com alopurinol e imunoterapia

Luana Dias de Moura

**BANCA EXAMINADORA:**



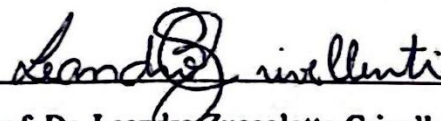
**Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz**  
(Presidente / Orientadora) / DMV/CCA / UFPI

Documento assinado digitalmente



FLAVIANE ALVES DE PINHO  
Data: 03/04/2023 17:23:00-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

**Profa. Dra. Flaviane Alves de Pinho**  
(Examinadora externa) / UFBA



**Prof. Dr. Leandro Zuccolotto Crivellenti**

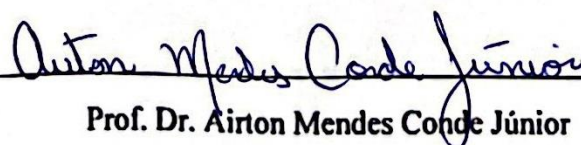
(Examinador externo / UFU)

Documento assinado digitalmente



LEOPOLDO FABRICIO MARÇAL DO NASCIMENTO  
Data: 03/04/2023 22:18:09-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

**Prof. Dr. Leopoldo Fabricio Marçal do Nascimento**  
(Examinador externo) / CPCE / UFPI



**Prof. Dr. Ailton Mendes Conde Júnior**

(Examinador interno) / DMOR / CCS / UFPI

Aos meus pais José Carlos Moura (*in  
memoriam*) e Maria das Graças Dias, pelo  
amor incondicional.

*Dedico*

*“Se ainda não dá para ser o exemplo de resultado, seja o exemplo de esforço, inevitavelmente você encontrará o caminho para o resultado!”*

*Caio Carneiro.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida, me guiando, me dando força e saúde.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade e apoio financeiro durante a pós-graduação. A coordenação de pós-graduação em tecnologias aplicadas a animais de interesse regional (PPGTAIR) e a todos os professores pelos ensinamentos nas disciplinas pagas durante o doutorado.

A minha querida MÃE. Por todo incentivo, pelos momentos difíceis, pela compreensão, pelo amor incondicional, pela proteção, pelo apoio e carinho. Obrigada por tudo.

Aos meus familiares, em nome do meu Tio Valdenir, por sempre acreditar em mim, pelo incentivo e motivação. Por estar presente em todas as fases de minha vida, tenho um carinho muito grande por você.

Agradeço à Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade realizar o curso de pós-graduação e por desenvolver o experimento, ao núcleo Integrado de morfologia e pesquisas com células-tronco, a Gerência do Centro de Zoonozes de Teresina, ao Hospital Veterinário (LASAN) pela contribuição na coleta de amostras e a para realização do experimento.

Agradeço a equipe maravilhosa com qual trabalho e a equipe que realizou o experimento, Leopoldo Marçal, Flaviane Pinho, Dayane Higino, Jackellyne Georgia, Tarsia Giabardo, Kellen Matuzzy, Amanda Karoliny, Nathalia Castelo Branco, Eduarda Sampaio, Jackeline Sousa, Nailson Melo, Matheus Sávio, Sávio Matheus, agradeço pela amizade, por todas as horas de dedicação, pela paciência, pelos conhecimentos adquiridos durante esses anos e pela confiança. Obrigada por tudo, sem o apoio de vocês eu não teria conseguido.

Agradeço a médica veterinária Rebeca Tavares e a Ingrid Farias, pela contribuição e suporte na realização dos exames ultrassonográficos e obtenção dos resultados de histopatológico renal.

Agradeço as veterinárias do setor de diagnóstico por imagem, por todas as dicas e contribuições com o trabalho, Mariela Gomes, Ana Caroline e Maria Angelica, e também agradecer a veterinárias do setor de patologia clínica Estefâne Dias e Lidiany Pires por também me tirarem muitas dúvidas em resultados obtidos durante o experimento, muito obrigada pela amizade e apoio de vocês.

Agradeço a equipe da UDVET, em nome de Werner Albuquerque, Aline Rosa e Raisia Melo por todos suporte na obtenção dos exames laboratoriais, muito obrigada pela atenção, apoio e amizade, admiro muito vocês.

Agradeço ao LASAN e NUPCELT, em nome do Thiago Saraiva e Herminio e a todos que compõem a equipe destes setores, obrigada pelo incentivo e contribuição de cada um. Agradeço ao seu Francisco por cuidar tão bem dos animais em experimento.

Aos amigos próximos que sempre me apoiaram em todos os momentos, pelas brincadeiras, pela convivência e por sempre estarem presentes na minha vida, Alisson Matheus, Maria Carolina, Ana Luiza, Ingrid Ramisa, Larissa Bessa, Jessica Oliveira, Camila Coutinho, Alinne Rosa, Werner Albuquerque, e todos os demais sintam-se citados.

Agradeço a Gerlania por ser meu braço direito em cuidados com minha querida Mãe, tenho muito carinho e consideração por você e toda sua família.

Agradeço à minha querida orientadora, Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz pelo incentivo do espírito da pesquisa, pelos ensinamentos e conhecimentos adquiridos, pela paciência, pela compreensão e pela confiança posta em mim. Não me canso de dizer que tenho maior admiração da pessoa que é, e a tenho como espelho e exemplo de vida. Obrigada por tudo, conte comigo sempre.

*Muito Obrigada!*



MOURA, Luana Dias. **Alterações renais de cães infectados por *Leishmania infantum* tratados com alopurinol e imunoquimioterapia**. 2023. 115 f. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina.

## RESUMO

A leishmaniose canina é causada por *Leishmania infantum chagasi* e é transmitida por flebotomíneos, ocorrendo no Brasil as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*. Os sinais clínicos da leishmaniose podem diferir de um cão para outro, vários órgãos e sistemas podem ser acometidos, incluindo o sistema urinário, variando desde proteinúria subclínica até síndrome nefrótica ou doença renal crônica (DRC), sendo uma das principais causas de morte em cães acometidos. A resistência ou progressão da doença dependerá da resposta imunológica do animal. A terapia para leishmaniose canina ainda é falha, a indução do tratamento com imunomodulação, imunoterapia ou imunoquimioterapia vem ganhando destaque nos estudos, como abordagens promissoras para o controle da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros renais de cães com leishmaniose submetidos a imunoquimioterapia, acompanhados por 360 dias. Estudo randomizado com 28 cães sem raça definida naturalmente infectados por *L. infantum*, foram divididos em três grupos: Grupo 1 com 6 cães que não receberam medicação, Grupo 2 com 8 cães que receberam alopurinol em monoterapia durante 90 dias, e o Grupo 3 com 8 cães que foram imunizados com a formulação Leish-F2 + SLA-SE, e receberam também a terapêutica com alopurinol por 90 dias. Exames ultrassonográficos com foco na avaliação renal, amostras de urina para detecção de proteinúria foram analisados pela razão proteína/creatinina urinária (RPC), urinálise (EAS) e ELISA padrão com SLA, bem como realização do histopatológico renal. O sinal medular renal observado em ultrassonografia surgiu e se manteve presente nos cães que não receberam terapêutica e nos cães que receberam apenas alopurinol, ao contrário do grupo que recebeu a imunoquimioterapia que retardou o surgimento desse achado durante os 360 dias de acompanhamento. A mineralização distrófica renal foi vista de forma mais evidente nos grupos de cães que receberam alopurinol em monoterapia ou na imunoquimioterapia. A detecção de proteína na urina como biomarcador de lesão renal, foi mais sensível pelo método de ELISA e teve resultados semelhantes vistos nas EAS, do que pela RPC nos grupos avaliados. Os cães sem terapêutica apresentam aumento dos anticorpos e o grupo alopurinol reduziu os anticorpos apenas no período de uso da droga e a imunoquimioterapia conseguiu reduzir os títulos de anticorpos na urina e sustentar os níveis baixos durante os tempos avaliados pelo teste ELISA. No histopatológico renal dos cães tratados e não tratados apresentaram alterações, tanto glomerular, quanto tubulointersticial, e cães que não receberam terapêutica tiveram maior predominância para nefrite tubulointersticial e glomerulosclerose o que pode levar à uma insuficiência renal. Concluindo assim que cães com leishmaniose que tendem a desenvolver DRC podem ter uma nefroproteção ao receberem imunoquimioterapia com alopurinol associado a imunização com Leish-F2 + SLA-SE.

**Palavras-chave:** cão, calazar, imunoquimioterapia, doença renal.

MOURA, Luana Dias. **Renal alterations in dogs infected with *Leishmania infantum* treated with allopurinol and immunochemotherapy**. 2023. 115 f. Thesis (Doctorate), Postgraduate Program in Technologies Applied to Animals of Regional Interest (PPGTAIR), Federal University of Piauí (UFPI), Teresina.

### ABSTRACT

Canine leishmaniasis is caused by *Leishmania infantum chagasi* and is transmitted by sandflies, occurring in Brazil as species *Lutzomyia longipalpis* and *L. cruzi*. Clinical signs of leishmaniasis can differ from one dog to another, several organs and systems can be affected, including the urinary system, ranging from subclinical proteinuria to nephrotic syndrome or chronic kidney disease (CKD), being one of the main causes of death in dogs affected. The resistance or progression of the disease will depend on the animal's immune response. Therapy for canine leishmaniasis is still flawed, induction of treatment with immunomodulation, immunotherapy or immunochemotherapy has been gaining prominence in studies, as promising approaches to control the disease. The objective of this work was to evaluate the renal parameters of dogs with leishmaniasis treated by immunochemotherapy, followed up for 360 days. Randomized study with 28 mongrel dogs naturally infected by *L. infantum*, divided into three groups: Group 1 with 6 dogs that did not receive medication, Group 2 with 8 dogs that received allopurinol in monotherapy for 90 days, and Group 3 with 8 dogs that were immunized with the Leish-F2 + SLA-SE formulation, and also received allopurinol therapy for 90 days. Ultrasound exams focused on renal evaluation, urine sample for detection of proteinuria were analyzed by neurological protein/creatinine ratio (RPC), urinalysis (EAS) and standard ELISA with SLA, as well as renal histopathology. The renal medullary signal observed on ultrasound appeared and remained present in dogs that did not receive therapy and in dogs that received only allopurinol, unlike the group that received immunochemotherapy that delayed learning in this way during the 360 days of follow-up. Renal dystrophic mineralization was more evident in the groups of dogs that received allopurinol in monotherapy or in immunochemotherapy. The detection of protein in urine as a biomarker of kidney damage was more sensitive by ELISA and had similar results seen in EAS than by the RPC method in the evaluated groups. Dogs without treatment showed increased levels of intoxication and the allopurinol group felt the symptoms only during the period of drug use and immunochemotherapy was able to reduce the levels of dependence in the urine and sustain the low levels during the waiting times for the ELISA test. In the renal histopathology of treated and untreated dogs, alterations, both glomerular and tubulointerstitial, and dogs that were not treated had a greater predominance of tubulointerstitial nephritis and glomerulosclerosis, which can lead to renal disease. Thus, concluding that dogs with leishmaniasis that tend to develop CKD may have nephroprotection when receiving immunochemotherapy with allopurinol associated with immunization with Leish-F2 + SLA-SE.

**Keywords:** dog, kala-azar, immunochemotherapy, kidney disease.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
<b>1. IMUNOPROFILAXIA E IMUNOTERAPIA NA LEISHMANIOSE</b>	
<b>CANINA</b> .....	<b>18</b>
1.1. Profilaxia e terapêutica na Leishmaniose Canina .....	18
1.2. Imunoprofilaxia na Leishmaniose Canina .....	21
1.3. Imunoterapia na Leishmaniose Canina .....	27
1.4. Perspectivas futuras .....	30
<b>2. LEISHMANIOSE E OS RINS</b> .....	<b>31</b>
2.1. Estadiamento da Leishmaniose Canina .....	31
2.2. Anatomia e fisiologia renal .....	33
2.3. Estadiamento da Doença Renal Crônica .....	34
2.4. Subestadiamento da Doença Renal Crônica .....	38
2.5. Método de ELISA com amostra de urina .....	43
2.6. Ultrassonografia .....	44
2.7. Glomerulonefrite .....	48
<b>3. Capítulo I: Renal alterations in dogs infected with <i>Leishmania infantum</i></b> <b>treated with allopurinol and immunochemotherapy</b> .....	<b>51</b>
<b>4. Capítulo II: Allopurinol therapy provides long term clinical improvement,</b> <b>but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in</b> <b><i>L. infantum</i> infected dogs</b> .....	<b>88</b>
<b>5. Considerações Finais</b> .....	<b>90</b>
<b>6. Referências da Revisão de Literatura</b> .....	<b>91</b>
<b>7. Anexo</b> .....	<b>113</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 01.** Grupos experimentais que receberam avaliação clínica e quantificação da carga parasitária em medula óssea. Grupo 1: não recebeu terapêutica. Grupo 2: recebeu terapêutica com alopurinol. Grupo 3 recebeu imunoterapia, imunização com uso do alopurinol -----56

**Figura 02.** Imagem renal de dois cães apresentando sinal medular renal, linha hiperecoica distinta na medula renal, paralela à junção corticomedular, presente na imagem A, rim esquerdo (G1) e na imagem B, rim direito (G2), após 63 dias de acompanhamento -----60

**Figura 03.** Imagem renal de cães apresentando mineralização distrófica renal, em imagem A, B e C cães que receberam monoterapia com alopurinol após 63 e 120 dias respectivamente, em imagem D cão que recebeu imunoterapia após 360 dias de acompanhamento -----61

**Figura 04.** Razão proteína/creatinina na urina (RPC): avaliação individual da RPC urinária de cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. em cada grupo (G1, G2, G3) entre os tempos (D0, D120, D360). A análise foi realizada a partir dos dados de média, desvio padrão, mediana e através do modelo linear misto de medidas repetidas, com intercepto aleatório por indivíduo. Não proteinúrico < 0,2; Proteinúrico Limítrofe 0,2-0,5; Proteinúrico > 0,5. Grupo controle (G1): seis cães que não receberam medicação, Grupo Alopurinol (G2): oito cães que receberam o alopurinol em monoterapia por via oral na dose 20 mg/Kg, 1x ao dia, durante 90 dias, Grupo Alopurinol e Vacina / Imunoterapia (G3): oito cães que foram imunizados por injeções subcutâneas com a formulação Leish-F2 + SLA-SE (20 µg cada), 6 doses, com intervalo de 3 semanas associados com alopurinol na dose de 20 mg/kg, 1x ao dia, durante 90 dias -----63

**Figura 05.** Proteinúria pela urinálise (EAS). Avaliação da presença de proteína na urina pela urinálise de cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. em cada grupo (G1, G2, G3) entre os tempos (D0, D120, D360). A análise foi realizada a partir dos dados de média, desvio padrão e mediana. Ausência de proteínas: menos que 10 mg/L; Traços de proteínas: entre 10-30 mg/L; 1+ = 30 mg/L; 2+ = 40-100 mg/L; 3+ = 150-350 mg/L; 4+ = maior que 500 mg/L (THRALL et al., 2015). Grupo controle (G1): seis cães que não receberam medicação, Grupo Alopurinol (G2): oito cães que receberam o alopurinol em monoterapia por via oral na dose 20 mg/Kg, 1x ao dia, durante 90 dias, Grupo Alopurinol e Vacina/ Imunoquimioterapia (G3): oito cães que foram imunizados por injeções subcutâneas com a formulação Leish-F2 + SLA-SE (20 µg cada), 6 doses, com intervalo de 3 semanas associados com alopurinol na dose descrita no G2 -----64

**Figura 06.** Anticorpos IgG em urinas de cães: nível de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. realizado pelo teste de ELISA, nos tempos D0, D120 e D360. Urina de cães proveniente de áreas endêmicas para Leishmaniose Canina testados com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). O cut-off foi calculado a partir da média dos valores negativos com a soma de um fator e as ODs com valores acima da faixa cinza (entre 0,22 e 0,27) são ditas reagentes. Os pontos nos gráficos representam a média das OD de cada amostra. A análise foi realizada pelo software GraphPad Prism 8.0. **A:** Avaliação do tempo entre os grupos. **B:** Avaliação de cada grupo entre os tempos. **G1:** seis cães que não receberam medicação, **G2:** oito cães que receberam o alopurinol em monoterapia por via oral na dose 20 mg/Kg, 1x ao dia, durante 90 dias, **G3:** oito cães que foram imunizados por injeções subcutâneas com a formulação Leish-F2 + SLA-SE (20 µg cada), 6 doses, com intervalo de 3 semanas associados com alopurinol na dose de 20 mg/kg, 1x ao dia, durante 90 dias - -----67

**Figura 07.** Histopatológico renal: Avaliação das principais glomerulonefrites e glomerulopatias de cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. nos grupos estudados (G1, G2, G3) após 360 dias de monitoramento. As imagens foram obtidas por microscopia de luz, na objetiva de 40x. Grupo controle (G1): cão que não recebeu medicação, Grupo Alopurinol (G2): cão que recebeu o alopurinol em monoterapia por via oral na dose 20 mg/Kg, 1x ao dia, durante 90 dias, Grupo Alopurinol e Vacina/

Imunoquimioterapia (G3): cão que foi imunizado por injeções subcutâneas com a formulação Leish-F2 + SLA-SE (20 µg cada), 6 doses, com intervalo de 3 semanas associados com alopurinol na dose descrita no G2. A: cão G1 observar nefrite intersticial e gloméruloesclerose. HE. 50µm. B: cão G2 Observar glomerulonefrite membranoproliferativa e discreta nefrite intersticial. HE 500µm. C: cão G3 Notar glomerulonefrite mesangioproliferativa e moderada nefrite intersticial. HE. 50µm ----

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Tabela 01** - Estádio da DRC baseado na creatinina e SDMA de paciente estável -----  
-----**37**

**Tabela 02** - Subestádio da DRC baseado na proteinúria em cães e gatos -----**41**

**Tabela 03** - Subestádio da DRC baseado na pressão arterial sistólica em cães e gatos  
-----**43**

### CAPÍTULO I

**Tabela 01** - Alterações renais observadas em ultrassom abdominal em modo-B de cães com leishmaniose, em grupo experimentais com e sem terapêutica durante 360 dias --  
-----**59**

**Tabela 02** - Avaliação da razão proteína creatinina urinaria (RPC) de cães com leishmaniose, em grupos experimentais com e sem terapêutica durante 360 dias -----  
-----**62**

**Tabela 03** - Histopatológico renal de cães com leishmaniose, em grupos experimentais com e sem terapêutica após 360 dias de acompanhamento -----**68**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AHCC	Active Hexose Correlated Compound
CanL	Leishmaniose Canina
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEEA	Comitê de ética em Experimentação Animal
DC	Células Dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
DRC	Doença Renal Crônica
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FML	Ligante Fucose Manose
GN	Glomerulonefrite
HVU	Hospital Veterinário Universitário
ICGN	Glomerulonefrite por complexos imunes
IFAT	Indirect Immunofluorescent Antibody Test
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IRIS	International Renal Interest Society
ITU	Infecção do Trato Urinário
LASAN	Laboratório de Sanidade Animal
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPL	Monofosforil lipídeo A
MPL-SE	MPL formulado em emulsão óleo-em-água
MS	Ministério da Saúde
NK	Células Natural Killer
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão Arterial



PAMPS	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPGTAIR	Programa de Pós-Graduação
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ROC	Característica de Operação do Receptor – Curva
RPC	Razão Proteína Creatinina Urinária
SDMA	Dimetilarginina Simétrica
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclea
SLA	Antígeno Solúvel de Leishmania
SLA-SE	Adjuvante Lipídico de Segunda Geração em emulsão óleo-em-água
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TLR	Receptores Toll-like
TOD	Target Organ Damage
TR-DPP	Rapid Test Dual-Path Platform
UFPI	Universidade Federal do Piauí
USG	Ultrassonografia
WHO	World Health Organization – Organização Mundial de Saúde

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose é um importante complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* transmitidas por vetores flebotomíneos que afetam humanos e animais (TABBABI, 2019). Considerada uma doença tropical negligenciada a qual se encontra entre as seis endemias de maior importância no mundo (DESJEUX et al., 2004; WHO, 2022).

Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, a infecção pode causar sintomatologia diferenciada, indo desde a forma cutânea até a forma mais grave, a visceral (ALVAR et al., 2006; SCOTT et al., 2004). Em 2020, mais de 90% dos novos casos de leishmaniose visceral (LV) notificados à Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorreram em dez países: Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Lêmen. Nas Américas, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 97% dos casos ocorrem no Brasil (WHO, 2022).

A leishmaniose canina (CanL; conhecida também como Leishmaniose Visceral Canina LVC) é causada por *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*, na América) e é transmitida pela picada de flebotomíneos, com ocorrência no Brasil das espécies *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*, conhecidos popularmente como “mosquito-palha” (ALVAR et al., 2006; MISSAWA & LIMA, 2006; BRITO et al., 2014). Os cães infectados constituem o principal reservatório doméstico do parasita e desempenham um papel fundamental na transmissão ao homem (Alvar et al., 2004; Verçosa et al., 2008), e por apresentarem elevado parasitismo cutâneo, são altamente eficientes na manutenção da doença nos focos endêmicos, favorecendo assim, a infecção dos vetores (AGUIAR et al.; 2007; MAIA-ELKHOURY et al; 2008).

O curso da infecção pode ser diferente de um cão para outro, variando da cura espontânea à evolução aguda que leva à morte, se o manejo e a terapia adequados não forem adotados. A cura parasitológica raramente é alcançada e as recorrências clínicas são frequentes (RIBEIRO et al., 2018). Os sinais clínicos mais frequentes em cães com LV são linfadenopatia, lesões do focinho ou orelha (úlceras), apatia, anorexia, mucosas pálidas, onicogrifose, lesões cutâneas, hemorragia, despigmentação do focinho ou lábio, alopecia, blefarite e ceratoconjuntivite (REIS et al., 2006, SILVA et al., 2017).

A ocorrência de lesões sistêmicas está diretamente relacionada com a resposta imune do hospedeiro e a evolução da doença. A resistência em animais com infecção subclínica dependerá da resposta celular Th1, e o surgimento dos sinais clínicos em

cães susceptíveis (sintomáticos) deve-se à capacidade desses animais de desenvolverem uma resposta humoral exacerbada do tipo Th2, resposta que resulta na persistência do parasita nos tecidos (BARBIERI, 2006).

A suspeita da leishmaniose canina é baseada em dados epidemiológicos e nos achados clínicos, entretanto ainda é considerado um diagnóstico complexo, visto que algumas doenças compartilham sintomatologia similar (MARZOCHI et al., 1985; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). No Brasil (nota técnica N°01/2011/MS) o método sorológico para diagnóstico consiste no TR DPP® utilizado como método de triagem e o de ELISA utilizando antígeno solúvel total de *Leishmania* sp. como teste confirmatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). A pesquisa por *Leishmania* por exame parasitológico direto ou por cultura é considerada padrão-ouro uma vez que visualização do parasito não deixa dúvida sobre a infecção (FERRER, 1997; SCHIMMING & PINTO E SILVA, 2012). A técnica de PCR em tempo real foi recentemente introduzida para detectar quantitativamente leishmanias no organismo, porém não faz parte da rotina de muitos laboratórios e não está padronizada pelo Ministério da Saúde no Brasil (MANNA et al., 2009; QUEIROZ et al 2010).

Estudos mostram que a vacinação profilática ou possivelmente pós-exposição será essencial para o controle final da doença (DUTHIE et al., 2012). Os avanços no conhecimento da resposta imune nos últimos anos levaram a um melhor entendimento da patogênese da LV, permitindo que novos tratamentos sejam desenvolvidos com base na ativação do sistema imunológico, que o uso de vacinas associado à quimioterapia, pode levar à melhora clínica e possível redução da carga parasitária desses animais (GONÇALVES et al., 2019).

O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros renais de cães com leishmaniose através do monitoramento via ultrassom abdominal, exames laboratoriais e na detecção de proteínas pela urina na razão proteína/creatinina (RPC) e pelo método de ELISA, bem como avaliação histopatológica renal, no intuito de identificar alterações precoces de lesão renal, direcionadas a enfermidade, e avaliar o desempenho renal de cães submetidos a imunoquimioterapia, acompanhados por 360 dias.

A organização estrutural dessa Tese se apresenta da seguinte forma: Introdução, Revisão de literatura (Imunoprofilaxia e imunoterapia na leishmaniose canina, leishmaniose canina e os rins), Capítulo I, Considerações Finais e Referências. O capítulo I, intitulado “**Renal alterations in dogs infected with *Leishmania***

*infantum* treated with allopurinol and immunochemotherapy.”, organizado conforme as normas do periódico “*Plos One*” Qualis A1 em Medicina Veterinária e fator de Impacto 3,752 e o capítulo II, intitulado: “**Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in L. infantum-infected dogs**” organizado conforme as normas do periódico “*Vaccine*” Qualis A2 em Medicina Veterinária e fator de Impacto 4,169.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. IMUNOPROFILAXIA E IMUNOTERAPIA NA LEISHMANIOSE CANINA

#### 1.1 Profilaxia e terapêutica na Leishmaniose Canina (CanL)

No Brasil as medidas de controle estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da população de flebotomíneos com inseticidas de ação residual., eliminação dos reservatórios domésticos, eutanásia em cães positivos, e atividades de educação em saúde (MINISTERIO DA SAÚDE, 2014).

Segundo Machado et al., (2016) relatam que a eutanásia de cães com leishmaniose, que deveria servir como instrumento para diminuir a ocorrência de uma doença emergente no Brasil, parece influenciar mais na estrutura da população canina do que no seu tamanho epidemiológico; implicações resultantes de uma população canina mais jovem podem ser graves. Portanto, ressalta a importância de programas de posse responsável de cães com enfoque na qualidade de vida, na prevenção contra flebotomíneo para reduzir o risco de infecção por *L. infantum* nesses cães, medidas de manejo ambiental sejam alternativas viáveis para a redução do contato do vetor com o homem. Associadas a essas ações, a educação em saúde torna-se um bom instrumento preventivo de intervenção do Poder Público para orientar a população e reduzir a ocorrência de casos humanos de leishmaniose.

Vários inseticidas e repelentes estão disponíveis na forma de coleiras, loções e pipetas que impregnam a pele do animal e previnem a picada do mosquito-palha. Ensaios controlados desses produtos deram bons resultados (LOPES et al.

2018). Os piretróides, em suas formulações, têm se mostrado eficazes na prevenção de picadas de flebotomíneos em condições de laboratório ou em condições de campo em cães com *L. infantum* (OTRANTO et al., 2013). Uso de coleiras contendo 4% de deltametrina com recomendação de uso a cada 4 meses (Scalibor, MSD Animal Health) mostrou-se útil no controle da infecção por *L. infantum* em áreas endêmicas com uma faixa de eficácia de 50%, 84% e 94% nos cães (FERROGLIO et al., 2008; FOGLIA et al., 2013). Uma outra coleira de matriz polimérica contendo 10% de imidacloprida e 4,5% de flumetrina (Seresto, Bayer Animal Health), foi lançada para o controle de carrapatos e pulgas em cães e gatos por até oito meses, embora não tenha registro com ação repelente, um estudo realizado apresentou eficácia de 93,4 a 100% na proteção de cães abrigados que viviam em áreas endêmicas de LV (OTRANTO et al., 2013; BRIANTI et al., 2014).

Portanto o uso de coleiras impregnadas com inseticidas que repelem o contato de flebotomíneos no cão pode prevenir ou reduzir o risco de transmissão da *L. infantum*. Dos estudos mais recentes, vimos que o uso de coleiras em cães impregnadas de deltametrina a 4% demonstrou ser a forma mais eficaz na redução da incidência de leishmaniose canina (ALVES et al., 2020), e que o Ministério da Saúde já possui projeto piloto para fornecer coleiras impregnadas com inseticida para o controle da leishmaniose canina no Brasil (ASSIS et al., 2020)

No Brasil (portaria interministerial nº 1.426/2008) é proibido o tratamento de leishmaniose canina com drogas de uso humano, como o antimoniato de meglumina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Na Europa, um dos tratamentos de primeira linha para o tratamento da Leishmaniose Canina (CanL) é a combinação de antimoniato de meglumina e alopurinol. No entanto, embora a maioria dos cães se recupere clinicamente após a terapia, a eliminação completa do parasita geralmente não é alcançada e os cães infectados podem eventualmente ter recaídas (SOLANO-GALLEGO et al. 2009) e também podem apresentar resistência ao parasita com uso dessas medicações (CARRIO e PORTUS, 2002; IKEDA-GARCIA et al., 2010; 2007; YASUR-LANDAU et al., 2017), além da possibilidade de toxicidade causada pelo antimoniato de meglumina (IKEDA-GARCIA et al., 2007). O alopurinol é considerado uma droga leishmanioestática, por apresentar remissão clínica em cães tratado contra leishmaniose, e na medicina veterinária, o alopurinol é o medicamento

de primeira escolha para tratamento de longo prazo (KOUTINAS et al. 2001; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A miltefosina (Milteforan®) é uma droga usada no tratamento da Leishmaniose Canina na Europa desde 2007 (RIBEIRO, 2016). O tratamento com a combinação de miltefosina e alopurinol, demonstrou eficácia leishmanicida em cães naturalmente infectados (MIRO et al., 2009). Por meio da nota técnica conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, assinada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária e pelo Ministério da Saúde (MAPA/MS), foi autorizado o registro do produto Milteforan® (Virbac Saúde Animal), para o tratamento exclusivo da leishmaniose visceral de cães no Brasil (MAPA/MS, 2016). Outros medicamentos contra CanL já foram estudados, como, enrofloxacina e marbofloxacina, mas são necessários mais ensaios clínicos controlados (FARCA et al. 2012). Uma nova tendência terapêutica é a combinação de drogas anti-leishmania e imunomoduladores com o objetivo de reduzir a carga do parasita e estabelecer uma resposta imune apropriada (GÓMEZ-OCHOA et al. 2009).

Além do tratamento com medicamentos citados, existem outros produtos propostos para modular a resposta imune, uma vez que cães tratados com drogas podem apresentar recaídas e permanecer infecciosos para os flebotomíneos, a indução do tratamento imunoestimulando o organismo do cão, como domperidona, citocinas e vacinas (imunoterapia) vem ganhando destaque em estudos contra CanL (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BAXARIAS et al., 2019).

Entre as medicações de ação moduladora presente no mercado, podemos citar a domperidona, que em humanos é utilizada como antiemético, com ação gastrocinética e indutora na liberação de prolactina, que atua na cascata da inflamação como citocina pró-inflamatória, agindo na ativação de resposta celular aumentando a produção de citocinas como INF- $\gamma$ , IL2, IL12 e TNF- $\alpha$  de perfil Th1, levando a ativação de macrófagos, seguida da diminuição da população de células perfil Th2 (HINTERBERGER-FISCHER et al., 2000; REDDYMASU et al., 2007). Em um estudo foi observado que o uso da domperidona pode levar a melhora clínica e redução nos títulos de anticorpos em cães com leishmaniose (GÓMEZ-OCHOA et al. 2009), entretanto essa medicação pode apresentar efeitos adversos ainda não bem descrito na medicina veterinária (VAN et al., 2010; BOYCE et al., 2012; ATHUKURI e NEERATI, 2017).

Travi e Miró (2018), orientam que além de novos ensaios necessários com uso da domperidona, orientam que médicos veterinários relatem consistentemente todos os efeitos adversos observados durante sua prática clínica, para obter uma maior segurança e a eficácia, uma vez que sua utilização tem impacto na saúde da população animal e humana.

A atual dificuldade no tratamento de cães com leishmaniose é a presença de xantínúria que pode evoluir para urolitíase, em decorrência do efeito secundário ao tratamento prolongado com alopurinol (JESUS et al., 2022), a resistência à droga também já foi descrita em estudos (YASUR-LANDAU et al., 2017). Segarra et al., (2017), demonstrou que o tratamento oral de 6 meses com nucleotídeos com hexose ativa (AHCC), associado com antimoniato de meglumina, mostrou eficácia semelhante ao atual tratamento de primeira linha para leishmaniose canina na europa, substituindo o alopurinol, possibilitando ausência de xantínúria. Segarra et al. (2018) demonstrou efeito preventivo de nucleotídeos com hexose ativa (AHCC) por 365 dias em cães clinicamente saudáveis infectados por *L. infantum*, formulação que levou a reduções nos títulos de sorologia por ELISA e na taxa de progressão da doença quando comparados a cães não suplementados.

Dea-Ayuela et al. (2020), demonstrou que o uso de nucleotídeos com hexose ativa (AHCC) aumenta a resposta imune de perfil Th1 eficaz *in vitro*, aumentando os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, RANTES e IL-1 $\alpha$ , reduzindo os níveis de citocinas IL-6 e IL-9, indicando que a combinação de nucleotídeos mais AHCC pode ser benéfica para a prevenção e tratamento da leishmaniose canina. Segarra (2021) relatou também que possíveis situações clínicas nas quais os nucleotídeos dietéticos podem ser úteis incluem seu uso como ferramenta preventiva para evitar a progressão da doença em cães infectados clinicamente saudáveis, como uma opção alternativa ao alopurinol em pacientes com xatinúria e/ou para evitar a resistência do parasita, como potencializador do tratamento padrão e /ou agente poupador de drogas, como potencial de fortalecer o desempenho de vacinas.

## **1.2 Imunoprofilaxia na Leishmaniose Canina (CanL)**

A vacinação é uma abordagem promissora para ajudar a controlar a leishmaniose, e interromper a transmissão do parasita *Leishmania*, sendo assim uma

estratégia econômica que induz proteção em longo prazo (OTRANTO & TORRES, 2013; PETITDIDIER et al., 2019).

Portanto, uma vacina eficaz contra a leishmaniose canina deve induzir imunidade forte e duradoura dominada por perfil Th1 (perfil de resistência), capaz de induzir aumento de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF  $\alpha$ , aumento da produção de óxido nítrico que induz a atividade anti-leishmania em macrófagos, para assim controlar tanto a progressão da infecção quanto a transmissibilidade do parasita através do vetor (REIS et al., 2010; KOUTINAS & KOUTINAS, 2014; GRADONI, 2015).

A seleção dos candidatos à vacina é desafiadora devido ao grande número de antígenos a serem avaliados com diferentes níveis de eficácia, dependendo de sua formulação e do modelo animal utilizado (JOSHI et al. 2014). Nos últimos anos em pesquisas pré-clínicas em modelos de roedores foram avaliadas a eficácia de várias categorias de antígenos de leishmania, incluindo parasitas mortos, frações purificadas de células, componentes de proteínas parasitas ou subunidades, proteínas recombinantes quirmônicas únicas ou múltiplas, DNA plasmídeo e partículas virais codificando fatores de virulência de parasitas. Pesquisas com vacinas com combinações promissoras de antígeno/adjuvante de cada uma das categorias acima também foram testadas em cães (DUTHIE et al., 2012; RAMAN et al., 2012; MUTISO et al., 2013; GRADONI, 2015).

As vacinas contra leishmaniose são classificadas em três gerações, vacinas de primeira geração, baseadas em parasitas mortos ou atenuados; vacinas de segunda geração, baseadas em proteína antigênica ou proteína recombinante; e vacinas de terceira geração derivadas de plasmídeos de DNA codificadores de antígeno, vacinas de DNA (ALLAHVERDIYEV et al., 2010; JAIN & JAIN, 2015).

No entanto, a obtenção de vacinas profiláticas seguras, eficazes, duráveis e de baixo custo contra a leishmaniose ainda é um grande desafio, induzir uma resposta forte e protetora específica no cão é uma tarefa árdua, uma vez que elucidar esse tipo de resposta mediada por células pela vacinação é mais difícil do que obter uma resposta humoral, especialmente dada a complexidade antigênica do patógeno e sua posse de mecanismos de evasão (TORRES & OTRANTO, 2016; IBORRA et al., 2018).

Para imunoprofilaxia na leishmaniose canina (CanL), as vacinas atualmente disponíveis representam um claro avanço no controle da doença, quatro delas foram licenciadas desde 2004, duas no Brasil (Leishmune®, cuja licença de produção e



comercialização foi retirada em 2014, e Leish-Tec®) e duas na Europa (CaniLeish® e LetiFend®) que mesmo após vários anos de comercialização, permanecem dúvidas quanto à eficácia e efetividade da vacina, potencial infeccioso de animais vacinados e infectados ou a interferência dos anticorpos induzidos pela vacina no diagnóstico sorológico de *L. infantum* (REIS et al., 2010; VELEZ & GALLEGO, 2020).

A vacina Leishmune® foi a primeira vacina licenciada no Brasil (sob o nº 8.627/2003/MAPA) contra a leishmaniose canina, uma vacina de segunda geração, composta por antígeno ligante fucose-mannose (FML) de promastigotas de *L. donovani* e um adjuvante de saponina (DA SILVA et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2005). Esta vacina apresentou estudos que progrediram para análise de Fase III de imunização. Em que seu primeiro ensaio demonstrou desenvolver proteção de 92-95% em cães vacinados e eficácia de 76-80% contra leishmaniose canina (DA SILVA et al., 2001). No segundo ensaio apresentou imunização duradoura por mais de três anos, com 95% de proteção contra doença clínica e 80% de eficácia da vacina, além de ter demonstrado diminuição da incidência da doença no cão e no homem na região que foi aplicado o ensaio (CABRERA et al., 2002).

Os cães vacinados com Leishmune® apresentaram ausência completa de sinais clínicos e de parasitas em amostras de pele, linfonodo e sangue em PCR, indicando uma condição não infecciosa desses cães vacinados sendo capaz de reduzir a infectividade canina para flebotomíneos, capaz de bloquear a transmissão (NOGUEIRA et al., 2005; SARAIVA et al., 2006; TORRES, 2006), porém apresentaram soroconversão específica, os cães foram soropositivos para a doença até seis meses após a vacinação com Leishmune®, em que não se podia diferenciar cães vacinados dos naturalmente infectados pelo teste sorológico (NOGUEIRA et al., 2005; VELEZ & GALLEGO, 2020). A licença da Leishmune® foi cancelada em 2014 pelo Ministério da Agricultura do Brasil pela falta de evidências da eficácia da vacina nos seus ensaios de Fase III (DE MENDONÇA et al., 2016; VELEZ & GALLEGO, 2020).

A Leish-Tec® é uma vacina de segunda geração, composta pela proteína recombinante A2 de amastigotas de *L. donovani* com saponina como adjuvante, que foi a segunda vacina licenciada no Brasil (sob o nº 9.270/2007/MAPA) e é, desde 2014 a única vacina canina autorizada e comercializada no país atualmente (REGINA-SILVA et al., 2016; LUNA & CAMPOS, 2020). Em um estudo em que se avaliou a imunidade protetora de cães com *L. chagasi* vacinados com proteína A2 recombinante

e saponina, observou-se que após a vacinação os animais tiveram aumento nos níveis de IgG total, principalmente de IgG2, aumento significativo de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-10, a vacina induziu proteção parcial dos cães, além de ter permitido a diferenciação sorológica de cães vacinados e infectados, ou seja, que após vacinação os cães imunizados permaneceram negativos nos métodos convencionais de sorodiagnóstico (FERNANDES et al., 2008). Testasica et al. (2014) também demonstrou que cães vacinados com Leish-Tec® não demonstraram reações cruzadas no teste padrão de sorologia brasileiro (ELISA ou teste DPP).

Em um estudo randomizado realizado em área endêmica no Brasil, a vacinação com Leish-Tec® demonstrou profilaxia em cães soronegativos, e uma redução no número de casos de leishmaniose canina no grupo vacinal comparado ao grupo controle, a eficácia vacinal foi de 71,4% quando avaliada por exames parasitológicos, 58,1% em exames parasitológicos quando associados ao xenodiagnóstico e 80,8% na soroconversão para o antígeno recombinante A2. O xenodiagnóstico detectou redução de 46,6% na transmissão para flebotomíneos de animais vacinados com sorologia anti-A2 positiva, porém este estudo não conseguiu demonstrar redução da infecciosidade de cães vacinados (REGINA-SILVA et al., 2016).

Outro estudo realizado por Grimaldi et al (2017) de eficácia da Leish-Tec relatou uma diferença significativa na incidência de infecção entre cães vacinados (27%) e cães do grupo controle (42%). Entretanto, observou-se uma proporção duas vezes maior de cães doentes entre os animais soropositivos imunizados (44%) quando comparados com o grupo controle (21,2%). Esse estudo sugeriu que a Leish-Tec apresenta efeitos protetores promissores, mas que precisa ser otimizada para ser eficaz em cães sob condições de campo, e que seu uso, assim como a eutanásia de cães, não teria impacto na incidência de leishmaniose canina em áreas de alta transmissão.

Em um estudo comparativo entre Leishmune e Leishtec, não foi encontrado diferenças significativas entre as vacinas em resposta humoral ou taxas de infecção e transmissão para o vetor flebotomíneo, a única diferença detectada foi uma taxa mais alta de reações adversas no grupo Leishtec (FERNANDES et al., 2014). Os efeitos adversos após administração de Leis-Tec não foram considerados grave, registrou reações adversas leves e específicas ao local de aplicação em cães vacinados (TOEPP et al., 2018). Dentre as reações apresentadas podemos citar apatia, disorexia,

sensibilidade, edema no local da aplicação/alopecia foram os mais relatados em um estudo, com 96,6% dos cães vacinados que apresentaram algum tipo de reação, principalmente, os animais de raças pequenas (MATIAS et al., 2020).

A CaniLeish (LiESP/QA-21) foi a primeira vacina produzida na Europa contra a leishmaniose canina, que foi licenciada em 2011, composta por proteínas excretadas-secretadas purificadas de *Leishmania infantum* (LiESP) e com adjuvante QA-21, uma fração altamente purificada da saponina *Quilaja saponária*. O primeiro ensaio realizado com CaniLeish mediu o efeito da vacina em relação a marcadores de imunidade humoral e celular em cães, onde apenas animais vacinados produziram anticorpos para LiESP e para o antígeno de superfície do parasita (PSA), com perfil de IgG2, demonstrou que a vacinação de cães com a vacina LiESP / QA-21 foi capaz de induzir uma resposta celular de perfil Th1, dentro de 3 semanas do curso da primeira dose, com produção de IFN- $\gamma$  quando expostos a antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA), que por sua vez foi eficaz *in vitro* na redução da carga parasitária em macrófagos autólogos pré-infectados (MORENO et al., 2012).

Em outro estudo avaliando esses marcadores, de imunidade humoral e celular, foi realizado um desafio em cães um ano após o esquema de vacinação primária com LiESP / QA-21 e sem receber uma injeção de reforço anual, onde foi introduzido por via intravenosa promastigotas de *L. infantum*. Os cães vacinados mantiveram respostas imunes mediadas por células significativamente mais fortes contra o parasita, apesar de um desafio virulento, e tiveram cargas parasitas médias significativamente mais baixas no final do estudo, associadas a uma probabilidade menor de desenvolver infecções ativas (MARTIN et al., 2014).

Anterior aos estudos com CaniLeish, um ensaio de campo de eficácia randomizado foi desenvolvido em áreas endêmicas na França em uma população de cães composta por grupo de vacinados com LiESAp / MDP e grupo controle, que foram estudados por um período de 2 anos, vacina esta composta por antígenos excretadas-secretadas purificadas de *Leishmania infantum* em formulação com dipeptídeo muramil (MDP) como adjuvante. Após dois ciclos de transmissão, a taxa de infecção por *Leishmania* foi de 0,61% em cães vacinados e 6,86% no grupo de placebo. A eficácia da vacina foi de 92%. Uma diferença clara entre os cães que receberam a vacina e os que receberam o placebo também foi estabelecida pelos resultados de seu estado imunológico (LEMESRE et al., 2007). No entanto, esta

formulação de vacina nunca foi licenciada para imunização de cães contra leishmaniose, e a mesma preparação antigênica foi associado a um adjuvante diferente para formular CaniLeish (VELEZ & GALLEGO, 2020).

O estudo randomizado de eficácia que antecedeu o licenciamento do CaniLeish, incluiu 90 cães acompanhados por dois anos em duas áreas endêmicas de leishmaniose canina, na Itália e na Espanha. A partir destes, foram designados aleatoriamente o grupo vacinado e grupo controle, com mesmos critérios de vacinação adotados em estudos anteriores. Com base nos resultados obtidos neste ensaio de campo, a eficácia de CaniLeish na prevenção de sinais clínicos foi de 68,4% e o nível de proteção da vacina foi de 92,7%, portanto assegurando que o uso da LiESP / QA-21 poderia fazer parte do programa abrangente de controle da leishmaniose canina (OLIVA et al., 2014).

Um estudo realizado com cães em áreas endêmicas na Itália, comparou a eficácia de duas coleiras com inseticidas e a vacina CaniLeish na prevenção de leishmaniose canina, onde não encontrou diferenças significantes no número de animais positivos nos grupos vacinados e controle após um ano de vacinação ( $p = 0,417$ ). Da mesma forma, não foram observadas diferenças no desenvolvimento de infecções sintomáticas ativas que foram medidas por resultados de citologia, testes de PCR e imunofluorescência indireta e aumento de linfonodos, entre os grupos ( $p = 0,495$ ) (BRIANTI et al., 2016). Porém em área endêmica da Itália outro estudo preliminar com xenodiagnóstico foi realizado para avaliar o potencial de infecciosidade de cães infectados com *Leishmania* previamente vacinados com CaniLeish. Os resultados não mostraram diferença na taxa de infecção de flebotômíneos em cães sintomáticos entre os grupos, mas a carga de infecciosidade foi considerada menor no grupo de cães vacinados (BONGIORNO et al., 2013).

A LetiFend foi a segunda vacina na Europa a ser comercializada como imunoprofilaxia para leishmaniose canina, é uma vacina recombinante que foi licenciada em 2016, formada por uma proteína quimérica “Q” com cinco fragmentos antigênicos de quatro proteínas ribossômicas diferentes de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b e LiP0, e histona H2A), sem adição de adjuvante (AGÊNCIA EUROPEIA DE MEDICAMENTOS, 2016).

A proteína Q foi então testada com combinações de diferentes adjuvantes (MOLANO et al., 2003; POOT et al., 2009), porém não foram observadas diferenças

entre os grupos vacinados com adjuvante e os animais de controle. Em um estudo paralelo, verificou-se que a imunização com a proteína Q sem adjuvantes (que corresponde à formulação comercial LetiFend) foi capaz sozinha de demonstrar um efeito protetor em cães vacinados contra infecção por *L. infantum* (CARCELÉN et al., 2009).

Fonseca (2020), avaliou os efeitos secundários em cães domésticos vacinados com CaniLeish® e Letifend®, a CaniLeish® desenvolveu efeitos adversos, na maioria relacionada ao porte do cão, em raças de pequeno porte, ao contrário os animais vacinados com Letifend® que não desenvolveram qualquer efeito adverso, com base na amostra estudada, a Letifend® demonstrou ser mais segura ao aparecimento de reações secundárias. Velez et al. (2020) avaliou a segurança e eficácia da vacina CaniLeish®, onde não foram observadas reações adversas graves nos cães vacinados, porém o estudo mostrou falha na eficácia relatada da CaniLeish® na prevenção da infecção ativa por *L. infantum* em cães de áreas endêmicas e naturalmente expostos ao parasita.

Em um estudo randomizado de pré-licenciamento da LetiFend de ensaio de fase III da vacina, incluiu 549 cães (275 vacinados e 274 controles) expostos à infecção natural em duas áreas endêmicas de leishmaniose canina na França e na Espanha durante dois anos. De acordo com os resultados desse estudo de campo, a probabilidade de um cão vacinado com LetiFend® desenvolver um caso confirmado ou sinais clínicos de leishmaniose em áreas endêmicas é, respectivamente, 5 e 9,8 vezes menor do que para um cão não vacinado. Portanto a LetiFend mostrou eficácia vacinal de 72% na prevenção de sinais clínicos de leishmaniose canina (COTRINA et al., 2018).

### **1.3 Imunoterapia na Leishmaniose Canina (CanL)**

O uso de imunoterapia na leishmaniose é imprescindível para o aumento da resposta imunológica, uma vez que o tratamento convencional desta doença é desafiador devido ao fato de que a cura parasitológica completa não ocorre. Além disso, o tratamento da doença com os medicamentos usados apresenta deficiências, portanto as respostas imunes do hospedeiro desempenham um papel crucial no desfecho dessa infecção (BAXARIAS et al., 2019).

Já se foi relatado em trabalhos o uso de vacinas comercialmente conhecidas com ensaios para imunoterapia, como a Leishmune (CABRERA et al., 2004; SANTOS et al., 2007) e a LeishTec (TOEPP et al., 2018), porém nas últimas décadas, novos estudos com imunoterápicos na leishmaniose canina vem crescendo consideravelmente, com uso de vacinas ou associações de vacinas com quimioterápicos.

A Leishmune® apresentou eficácia na imunoterapia em cães com leishmaniose quando usada com concentração aumentada de adjuvante de saponina (em dose dupla), demonstrou reduzir os sintomas clínicos e as evidências do parasita, modulando o desfecho da infecção e o potencial de infecciosidade do cão para flebotomíneos (CABRERA et al., 2004; SANTOS et al., 2007).

A imunoquimioterapia (ICT) também foi testada utilizando a vacina Leishmune® associada ao alopurinol e Anfotericina B e foi observada maior eficácia em relação a imunoterapia (IT) sozinha do que associada as drogas de tratamento, com resultados negativos de PCR de linfonodos obtidos em 80% dos cães tratados com ICT, mas apenas em 33% do grupo de IT, reduzindo não só os sintomas, mas também a condição de infecção latente (BORJA-CABRERA et al., 2009).

A eficácia de Leish-Tec como vacina imunoterapêutica também foi testada num estudo de campo randomizado e duplo-cego com 557 cães com infecção subclínica soropositivos para *L. infantum*. Após nove meses, foi medido o risco de progressão clínica e mortalidade por todas as causas, no qual apresentou redução em 25 e 70% respectivamente, em cães vacinados aos seis anos de idade ou animais mais jovens. Este estudo mostrou a capacidade da Leish-Tec ser usada como imunoterapia eficaz na redução da progressão da doença e da mortalidade de cães assintomáticos infectados, e que novos estudos devem ser mantidos (TOEPP et al., 2018). Somente a vacina Leish-Tec® está disponível no Brasil, enquanto a vacina Leishmune® foi retirada do mercado (DE MENDONÇA et al., 2016; VELEZ & GALLEGU, 2020).

Uma vacina promissora que vem sendo estudada para imunoterapia na Leishmaniose Canina é a de antígeno de poliproteína recombinante Leish-111f, conhecida também como Leish-F1, formulado com monofosforil lipídeo A em emulsão estável (MPL-SE), foi a primeira subunidade da vacina a ser avaliada em humanos. A vacina foi protetora contra a leishmaniose cutânea e visceral em camundongos (COLLER et al., 2002; COLER et al., 2007) e demonstrou ser segura e

bem tolerada em humanos (Vélez et al., 2009). MPL-SE serve como um adjuvante eficaz para induzir respostas protetoras Th1 (REED et al., 2003).

Em um estudo com essa formulação de vacina, Leish-111f, avaliou-se a eficácia para imunoterapia e imunoquimioterapia de cães com leishmaniose. O estudo foi realizado em área endêmica no Brasil em um ensaio com cães naturalmente infectados, divididos em 3 grupos, grupo 1 recebeu Leish-111f + MPL-SE; o grupo 2 foi tratado com Glucantime; o grupo 3 recebeu uma combinação da vacina e Glucantime; e o grupo 4 não recebeu tratamento. A melhora clínica após 6 meses foi identificada nos grupos 1-3 (100%, 80% e 92% respectivamente). Em avaliação dos exames após 36 meses a eficácia foi de 75% dos cães no grupo da vacina (grupo 1), 64% e 50% foram observadas para cães nos grupos de tratamento com Glucantime (grupo 2) e Vacina + Glucantime (grupo 3), respectivamente (TRIGO et al., 2010).

A eficácia terapêutica da vacina Leish-111f + MPL-SE foi reconfirmada em um estudo cego subsequente, onde foi eficaz para casos leves de Leishmaniose Canina e foi comprometida em cães com doença grave. Essa formulação Leish-111f + MPL-SE apresentou resultados que demonstraram a melhora clínica em cães que receberam adjuvante sozinho. As melhorias clínicas observadas no grupo de Adjuvante podem ser devido à atividade imunoestimuladora do MPL como um ligante de Toll-like receptor 4 (TLR4) que ativa diretamente as células nas vias de resposta imune inata e, pode estimular uma atividade anti-parasita, e resposta imune adaptativa (TRIGO et al., 2010). Os adjuvantes são usados para ajudar o antígeno a desencadear uma resposta imune rápida, intensa e duradoura (Nascimento et al., 2018). Os agonistas de receptores Toll-like (TLR) são compostos promissores para prevenção e imunoterapia na leishmaniose humana e canina (ROATT et al., 2014).

Os receptores Toll-like (TLRs) são proteínas transmembrana do tipo I que constituem uma das primeiras linhas de defesa contra patógenos. Os TLRs estão localizados no plasma ou nas membranas internas das células inflamatórias, incluindo macrófagos, células dendríticas (DC), células NK e linfócitos (T e B), além de outros tipos de células, como os queratinócitos. Sua função é ligar estruturas moleculares conservadas encontradas em grandes grupos de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e induzir a secreção de citocinas inflamatórias, como interferon tipo 1 (IFN), quimiocinas e moléculas coestimulatórias (Medzhitov, 2001; Oda & Kitano, 2006). Os agonistas de TLR são PAMPs naturais e sintéticos que se ligam aos

TLRs para ativar as vias de sinalização para gerenciar as respostas imunes inatas e adquiridas (GNJATIC et al., 2010; STEINHAGEN et al., 2011).

Existem dez TLRs (TLR1 - TLR10) descritos em cães (CUSCÓ et al., 2014). A maioria dos estudos até o momento destaca a ativação de TLR2, TLR4 e TLR9, que contribuem na resposta imune contra a infecção por *Leishmania* (FARIA et al., 2012).

Em um estudo realizado em área endêmica no Brasil, com cães naturalmente infectados, foi investigado impacto clínico e parasitológico do tratamento em curto prazo com alopurinol, sozinho ou em combinação com uma vacina de subunidade definida, a Leish-F2, que é a vacina modificada a partir da proteína de fusão Leish-111f, formulada com o receptor TLR4, adjuvante Lipídico de Segunda Geração (SLA) em emulsão estável (SE; SLA-SE). Nos resultados foi observado que cães que não receberam tratamento tiveram um declínio progressivo em sua condição clínica e um aumento em seus níveis de infecção, enquanto o tratamento com alopurinol sozinho aliviou os sintomas clínicos, mas não gerou redução sustentada de parasitas. A imunização concomitante com Leish-F2 + SLA-SE, no entanto, melhorou a condição clínica, ao mesmo tempo que proporcionou eliminação de *L. infantum* em longo prazo em tecidos linfóides e órgãos sistêmicos (NASCIMENTO et al., 2020).

#### **1.4 Perspectivas futuras**

A imunoprofilaxia, imunoterapia ou imunoquimioterapia em cães são abordagens necessárias e promissoras para o controle da doença tanto no cão quanto no homem, uma vez que a leishmaniose visceral é enfermidade de importância para saúde pública. O tratamento convencional ainda é complexo, já que não é visto sucesso na cura parasitológica, estudos devem ser mantidos quanto à eficácia de proteção, risco de infectividade e transmissão da doença em cães vacinados (GONÇALVES ET AL., 2019).

As comparações entre vacinas já registradas devem ir além da confirmação de resultados sorológicos e parasitológicos negativos, e sim aproveitar também os testes de imunidade mediada por células (MORENO, 2019), na busca por biomarcadores relacionados à resistência ou suscetibilidade nas avaliações de imunogenicidade e proteção de vacinas, capaz de selecionar uma melhor candidata na



imunização contra Leishmaniose Canina e fornecer uma maneira para a indústria veterinária registrar produtos imunobiológicos comerciais de maior eficácia (GIUNCHETTI et al., 2019). Este último deve ser usado nas diferentes fases do desenvolvimento clínico das vacinas de Leishmaniose Canina e ser incorporado no acompanhamento dos animais vacinados envolvidos e nos ensaios de Fase IV pós-comercialização (MORENO, 2019).

Contudo o percurso ainda é árduo nos ensaios da busca por candidatos de vacinas com ou sem adjuvantes capazes de induzir uma resposta imune protetora e duradoura, na busca de evidências quanto à sua eficácia, efetividade e eficiência para o controle da leishmaniose humana e canina.

## **2. LEISHMANIOSE CANINA E OS RINS**

### **2.1 Estadiamento da Leishmaniose Canina (CanL)**

Um grupo de estudo europeu de leishmaniose canina, o Leishvet, desenvolveu diretrizes com recomendações para ajudar o clínico veterinário no manejo da enfermidade, abrangendo estudos baseados em evidências científicas e embasamento clínico, abordando desde a avaliação clínica do cão, ao diagnóstico, tratamento, monitoramento, controle e prevenção da leishmaniose canina (SOLANO-GALLEGO et al., 2009, 2011; LEISHVET, 2022).

Dentre as manifestações clínicas descritas pelo Leishvet (2022) podemos citar as gerais como linfadenomegalia, emagrecimento, inapetência, mucosas pálidas, esplenomegalia, poliúria e polidipsia, febre, vômito, diarreia, podem apresentar alterações cutâneas, como as dermatites, onicogribose, alterações oculares, como uveíte, blefarite, conjuntivite, e outras alterações como lesões ulcerativas, epistaxe, poliartrite, vasculites, glomerulonefrites, alterações neurológicas, dentre outras.

Em exame hematológico de cães com leishmaniose podemos ver a presença de anemia, não regenerativa à regeneração mínima ou moderada, trombocitopenia, hiperproteinemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, azotemia renal, aumento de enzimas hepáticas, proteinúria são alterações laboratoriais que podem ser observadas em cães com leishmaniose visceral (LEISHVET, 2022).

O diagnóstico para leishmaniose canina baseia-se nos sinais clínicos e/ou laboratoriais compatíveis com a doença e na confirmação da infecção por *L. infantum*

através de técnicas sorológicas, parasitológicas e moleculares (LEISHVET, 2022). Sabemos que no Brasil, o ministério da saúde recomenda o teste de DPP como triagem e o ELISA como confirmatório (Ministério da saúde-nota técnica, 2011). Entretanto no ambiente particular temos um leque maior de possibilidade de investigação, principalmente quando lidamos com cães com infecção subclínica, ditos assintomáticos, clinicamente saudáveis e sem alterações laboratoriais de rotina. No método parasitológico podemos citar o exame direto com aspirado de medula e linfonodo, citologia, imuno-histoquímica e cultura, os sorológicos temos os qualitativos (testes rápidos) e os quantitativos (RIFI e ELISA), e o método molecular temos o qualitativo que chamamos de convencional que detecta ou não o DNA do parasita, e o quantitativo chamado também de real time, que detecta e quantifica a carga parasitaria da *L. infantum* (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; LEISHVET, 2022).

Seguindo as diretrizes do LEISHVET, uma vez o cão diagnosticado com leishmaniose visceral, este deve ser estadiado, ou seja, ser classificado em qual estágio da doença se encontra. O sistema do estadiamento classifica a doença em quatro estádios (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; LEISHVET, 2022), e cinco estádios nas diretrizes adaptada pelo BRASILEISH com embasamento nas descritas pelo LEISHVET. O estadiamento para leishmaniose canina tem como objetivo ajudar o médico veterinário a determinar terapia adequada, formular um prognóstico e implementar etapas de acompanhamento para o manejo do cão com leishmaniose (BRASILEISH, 2018; LEISHVET, 2022; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

O estadiamento inicial vai do estágio por infecção subclínica a clínica leve presente, aquele cão de sorologia com títulos baixos de anticorpos e/ou parasitológico negativo, com ausência ou presença de sinais clínicos (leves), sem alterações laboratoriais, podendo este iniciar o tratamento ou monitorar sem tratamento o percurso da doença e que apresenta prognóstico bom. O estágio seguinte, de doença moderada segue com sorologia com títulos baixos à altos de anticorpos e parasitológico positivo, com alterações laboratoriais presentes, em que o perfil renal nos bioquímicos pode apresentar normal ou alterado, e uma vez alterado orienta-se seguir um segundo estadiamento, as diretrizes da International Renal Interest Society (IRIS) para manejo da nefropatia e investigação de doença renal crônica, nesse estágio da leishmaniose canina o tratamento é necessário incluindo leishmanioestático,

leishmanicida, imunoterapia, imunomodulador, tratamento que vai depender do país e portarias de recomendação do uso de fármacos em cão e do intervalo entre as medicações e necessidade de cada paciente, sendo o prognóstico bom à reservado. Já nos últimos estádios da leishmaniose canina que vai de grave à muito grave, encontramos níveis de anticorpos médios à altos, parasitológico positivo, sinais clínicos avançados e lesões por deposição de imunocomplexos como uveíte, glomerulonefrite, poliartrite, vasculites, anemia arregenerativa e com doença renal crônica, podendo evoluir para tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio final, com prognóstico reservado à ruim e com risco de óbito (BRASILEISH, 2018; LEISHVET, 2022).

A glomerulonefrite é resultante da deposição de imunocomplexos nos rins e está relacionada devido a presença de altos títulos de anticorpos e carga parasitaria elevada, ou seja, uma resposta imune humoral exacerbada com ação de linfócitos perfil Th2, que induzem a progressão da leishmaniose e conseqüentemente da doença renal, sendo essa, muitas vezes, a principal causa de morte em cães com leishmaniose (BANETH et al., 2008; SILVA, 2007).

## **2.2 Anatomia e fisiologia renal**

O sistema urinário é formado pelos rins, ureteres, bexiga e uretra, sendo tais estruturas dispostas na cavidade abdominal e pélvica, que recebem classificação quando divididos, em trato urinário superior, composto por rins e ureteres e trato urinário inferior, composto por bexiga e uretra, essa classificação é importante na descrição de processos infecciosos, que em conjunto com órgãos genitais podem ainda receber o termo urogenital, quando ambos sistemas são descritos e os mesmo possuem particularidades entre os gêneros (CRIVELLENTI e GIOVANINNI, 2021; KLEINE, 2014).

O rim é um órgão pareado, localizado no espaço retroperitoneal, órgãos pares que em cães possuem formato de feijão e coloração vermelho-acastanhada, envolvido por tecido gorduroso, opostamente aos músculos sublombares e lateral à coluna vertebral. O rim direito possui uma localização mais cranial, ventralmente aos processos transversos das quatro primeiras vértebras lombares, que se aloja na fossa do lobo caudado do fígado, quanto o rim esquerdo, mais caudal está ventral aos processos transversos da segunda à quinta vértebras lombares, cranialmente ao baço,

ao omento maior e a curvatura maior do estomago. Os rins dos cães possuem menor mobilidade comparado aos rins dos gatos (ELLENPORT et al. 1986; KONIG e LIEBICH, 2004; JERICÓ et al., 2015; CRIVELLENTI & GIOVANINNI, 2021).

Ao corte longitudinal do rim, quatro regiões são observadas macroscopicamente, sendo representadas (de forma externa em direção ao interior do órgão) pela cápsula fibrosa, denominada cápsula renal, sob a cápsula renal externamente está o córtex e, mais internamente, a medula e pelve renal. Nos carnívoros o rim é unilobar (ou unipiramidal), a proporção corticomedular é de aproximadamente 1:2 ou 1:3. Na avaliação microscópica do parênquima renal, observamos a unidade funcional do rim, o néfron, que nos cães cerca de 500.000 néfrons são encontrados em cada rim (DYCE et al., 2004; JERICÓ et al., 2015; REECE & DUKES, 2017; CRIVELLENTI & GIOVANINNI, 2021).

O néfron é a unidade morfofuncional responsável pela filtração do plasma e formação da urina; composto pelo glomérulo, cápsula do glomérulo, túbulo contorcido proximal, alça de Henle (ramo descendente delgado, ramo ascendente delgado, ramo ascendente espesso), túbulo contorcido distal e ducto coletor, que desemboca na pelve renal. A urina é formada no interior de cada néfron em três etapas: filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular, reguladas por hormônios de origem renal e não renal (JERICÓ et al., 2015; REECE & DUKES, 2017).

Os rins recebem aproximadamente 25% do débito cardíaco e têm como papel principal filtrar o sangue e excretar os resíduos metabólicos e na ação de reabsorção os rins recuperam algumas substâncias filtradas requeridas pelo organismo, caracterizando os rins como órgãos excretadores e reguladores (LUNN, 2011).

Portanto os rins desempenham importantes funções no organismo, tais como a manutenção do equilíbrio ácido-básico, hidroeletrolítico e da homeostase. O sistema renal é responsável pela metabolização e excreção de substâncias tóxicas, tendo também a função endócrina (produção de eritropoietina e metabolismo da vitamina D), atuando no controle da pressão arterial através do sistema renina-angiotensina-aldosterona e sendo ainda local de ação de hormônios como o paratormônio e o hormônio antidiurético (CUNNINGHAM, 2004).

## **2.3 Estadiamento da doença renal crônica**

### **2.3.1. Creatinina e SDMA**

Um grupo internacional com 14 veterinários nefrologistas, de oito países diferentes, desenvolveram a IRIS, a Sociedade Internacional de Interesse Renal. A IRIS foi criada para promover a compreensão científica da doença renal em pequenos animais, a sociedade surgiu no 8º Congresso Anual da Sociedade Europeia de Medicina Interna Veterinária em Viena, Áustria, em 1998 (IRIS, 2019).

A missão do IRIS é ajudar os médicos veterinários a diagnosticar, entender e tratar melhor as doenças renais em cães e gatos. Para cumprir essa missão, o grupo investiga maneiras de diagnosticar com precisão os primeiros sinais de doenças renais crônicas e lesões renais agudas e explora novas terapias para essas doenças, portanto o conselho da IRIS estabeleceu um conjunto de diretrizes com reconhecimento internacional sobre o diagnóstico e tratamento de doenças renais em pequenos animais. O grupo permanece em busca com estudos científicos da doença renal a fim de avançar em nossa abordagem desse importante problema (IRIS, 2019).

O estadiamento da doença renal crônica (DRC) é realizado após o diagnóstico de DRC, que é embasado no histórico, anamnese, achados do exame físico e dos exames laboratoriais, para assim realizar o monitoramento do paciente. Essa classificação considera os estágios da doença de acordo com o tempo de evolução e a presença de marcadores de lesão renal. O objetivo principal é auxiliar no estabelecimento do diagnóstico, do prognóstico e da terapia adequada conforme cada estágio e, assim, retardar a perda da função dos rins e a evolução da doença renal e, dessa forma, propiciar melhor qualidade de vida ao paciente (WAKI et al., 2010; JERICÓ et al., 2015).

O estadiamento baseia-se inicialmente na creatinina sanguínea em jejum (idealmente 12 horas), avaliada em pelo menos duas ocasiões no paciente estável. O paciente é então subestadiado com base em proteinúria e pressão arterial sistêmica, estes dois fatores têm importância comprovada na progressão da doença renal (POLZIN et al., 2005; IRIS, 2019).

A estabilização do paciente deve ser feita antes de proceder o seu estadiamento e a sua classificação deve ser feita assim que a concentração de creatinina estabilize, a sua medição deve ser feita com o paciente em jejum e hidratado e é também imperativa a exclusão de qualquer outra causa possível para elevação da concentração de creatinina (falência renal aguda, azotemia pré-renal e pós-renal).

Portanto o sistema de estadiamento da IRIS é aplicável apenas em cães e gatos com DRC estável e não é adequado para outras doenças que afetam a função do rim, nas quais a concentração plasmática de creatinina pode mudar drasticamente num curto período (ELLIOTT e WATSON, 2009).

A avaliação renal através da concentração sérica de creatinina é bastante utilizada na rotina clínica, considerando um dos principais biomarcadores renais, apesar das suas limitações. No qual a azotemia pode ser influenciado por fatores extrarrenais (idade, sexo, massa muscular e a ingestão proteica), a creatinina é dita como um biomarcador considerado tardio, porém na DRC pequenos aumentos dela são monitorados e considerados como fator preponderante para o estadiamento e definição do prognóstico de pacientes renais (PRESSLER, 2013; COWGILL et al., 2016; GRAUER, 2019; SEGEV, 2022).

Devido às limitações da creatinina sanguínea como um indicador precoce da DRC, um novo marcador substituto da taxa de filtração glomerular (TFG), o SDMA sanguíneo, foi lançado pelos Laboratórios IDEXX em 2015. O SDMA ou Dimetilarginina Simétrica, é uma pequena molécula liberada na corrente sanguínea durante a degradação de proteínas. O SDMA é derivado da metilação intranuclear da L-arginina pelas proteínas-arginina metiltransferases e liberado no sangue após proteólise. O SDMA é eliminado principalmente por filtração glomerular e não é afetado pela reabsorção ou secreção tubular e, portanto, pode ser usado como um marcador substituto da TFG. A produção de SDMA não depende da massa muscular, diferente da creatinina. Atualmente, o ensaio SDMA referido no sistema de estadiamento IRIS DRC é baseado no ensaio oferecido pelos Laboratórios IDEXX e, portanto, é padronizado para um método exclusivo (ELLIOTT e WHITE, 2019; GRAUER, 2019).

O SDMA no sangue aumenta mais cedo do que a creatinina em cães e gatos com anormalidades renais bem caracterizadas que levam à perda progressiva de tecido renal. O SDMA sérico pode ser um biomarcador mais sensível para a detecção de DRC precoce em comparação com a creatinina (ELLIOTT e WHITE, 2019; GRAUER, 2019). Quando a função renal diminui, ou seja, conforme a TFG diminui, o SDMA aumenta, em média, quando há uma perda de 40%, ou até mesmo apenas 25%, da função renal. A creatinina, por sua vez, só aumenta quando a perda da função renal atinge 60-75% (HALL et al., 2014, 2016; NABITY et al., 2015).

Entretanto não se pode esperar que nenhum teste único seja um marcador ideal de doenças renais em todas as subpopulações de pacientes. Testar em paralelo, ou seja, testar creatinina e SDMA ao mesmo tempo, melhorará a sensibilidade diagnóstica (detectando mais cães e gatos com DRC inicial), mas provavelmente reduzirá a especificidade (suspeita de DRC em pacientes normais) (ELLIOTT e WHITE, 2019).

Ter dois marcadores para se basear no estadiamento da DRC leva à possibilidade de que eles possam dar resultados diferentes. Com base na experiência com creatinina e SDMA, pode haver discrepâncias entre SDMA e creatinina (um valor dentro do normal enquanto o outro está fora do intervalo de referência). Dentre as causas que podem dar discrepância podemos citar doenças concomitantes, alteração na massa muscular, variação biológica, raça e questões técnicas de laboratório (ELLIOTT e WHITE, 2019).

Quando houver concentrações limítrofes de creatinina e SDMA ou resultados discrepantes no diagnóstico de um paciente com DRC, a IRIS recomenda repetir o exame de sangue em aproximadamente 2 semanas para confirmar os resultados originais e depois aproximadamente a cada 3 a 6 meses, dependendo de outros fatores do paciente, lembrando que o diagnóstico de DRC requer a incorporação de todos os dados clínico-patológicos disponíveis e para que as alterações laboratoriais sejam persistentes ao longo do tempo em um paciente adequadamente hidratado (ELLIOTT e WHITE, 2019; GRAUER, 2019). O estadiamento da IRIS com valores de creatinina e SDMA em cães e gatos estáveis diagnosticados com DRC incluem (**Tabela 01**):

**Tabela 01. Estádio da DRC baseado na creatinina e SDMA de paciente estável.**

Biomarcador Renal	Espécie	Estádio 1 (Sem azotemia, creatinina normal)	Estádio 2 (Azotemia renal discreta, creatinina levemente aumentada)	Estádio 3 (azotemia renal moderada)	Estádio 4 (Azotemia renal grave)
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	Cães	<1,4	1,4-2,8	2,9-5,0	>5,0
	Gatos	<1,6	1,6-2,8	2,9-5,0	>5,0
<b>SDMA (µg/dL)</b>	Cães	<18	18-35	36-54	>54
	Gatos	<18	18-25	26-38	>38

Fonte: Adaptado IRIS Staging of CKD (modified 2023). Disponível: [http://iris-kidney.com/pdf/2\\_IRIS\\_Staging\\_of\\_CKD\\_2023.pdf](http://iris-kidney.com/pdf/2_IRIS_Staging_of_CKD_2023.pdf)

Testes adicionais que podem ajudar a caracterizar melhor a possível doença renal e/ou complicações associadas à doença renal incluem exame de urina completo

com exame de sedimento urinário, cultura de urina, pressão arterial, razão proteína/creatinina na urina e imagem do trato urinário com radiografias e ultrassonografia (GRAUER, 2019).

Dos fatores de risco para lesão renal, podemos identificar proteinúria e hipertensão arterial, que estão relacionados a uma taxa mais rápida de progressão da doença renal e os fatores de risco terminal incluem a hiperfosfatemia, anemia e perda de massa corporal, que estão associados ao aumento da morbidade e mortalidade em cães e gatos (BARTGES, 2012; GEDDES et al., 2013; PARKER; FREEMAN, 2011).

Portanto a IRIS recomenda que após o estadiamento, cães e gatos devem ser subestadiados sempre que possível com base em dois outros fatores importantes: a quantidade de proteína excretada na urina e a pressão arterial sistêmica. A avaliação dessas duas variáveis é recomendada porque a proteinúria e a hipertensão arterial sistêmica podem ocorrer separadamente ou juntas em qualquer estágio da DRC. Além disso, ambos são fatores de risco independentes conhecidos para lesão renal progressiva em medicina humana que justificam protocolos de tratamento específicos; o mesmo provavelmente vale para cães e gatos (ELLIOTT e WHITE, 2019).

## **2.4 Sub-estadiamento da doença renal crônica**

### **2.4.1. Proteinúria**

Proteinúria é um termo geral que descreve a presença de qualquer tipo de proteína na urina, como albumina, globulinas e proteínas de Bence Jones. E é interpretada de acordo com os mecanismos e suas origens pré-renal, renal ou pós-renal. As causas da proteinúria podem ser fisiológicas ou patológicas (COWGILL et al., 2016; GRAUER, 2022).

A proteinúria fisiológica, trata-se de uma situação temporária, com remissão natural e de baixa magnitude. É também designada proteinúria benigna. Alguns exemplos de condições que podem provocar proteinúria fisiológica incluem exercício intenso, convulsões, piroxia, exposição extrema ao calor ou frio e o estresse. Quando a proteinúria se revela persistente, trata-se de uma situação patológica (LEES et al., 2005).



A proteinúria urinária patológica pode ter origem renal ou extra-renal (pré e pós renais), a proteinúria pré-renal implica a existência de concentrações anormalmente elevadas de proteínas plasmáticas de baixo peso molecular, exemplo disso inclui a produção de proteínas de Bence Jones (hemoglobina, mioglobina e imunoglobulinas de cadeias leves) podem ser filtradas e sobrecarregar o processo de reabsorção nos túbulos renais, podendo causar situações como lesão muscular (mioglobina), hemólise intravascular (hemoglobina), plasmocitoma, mieloma múltiplo (proteína de Bence-Jones) ou administração excessiva de plasma, levando ao surgimento de proteinúria. Na proteinúria pós-renal, está frequentemente associado à inflamação ou hemorragia do trato urinário inferior. As alterações do sedimento urinário podem refletir a causa subjacente, por exemplo, urolitíase, neoplasia, trauma ou cistite bacteriana. Infecções ou inflamações genitais (vaginite, prostatite) também são causas pós-renais de proteinúria, A proteinúria pós-renal nunca é persistente uma vez que a condição subjacente é removida (GRAUER, 2010; SINK e WEINSTEIN 2012; HARLEY e LANGSTON, 2012).

A proteinúria de origem renal resulta de dois mecanismos principais: o primeiro é a perda da filtração glomerular seletiva, resultando em aumento da quantidade de proteína plasmática no filtrado; a segunda é uma reabsorção tubular prejudicada da proteína filtrada. A albumina é a proteína predominante na urina de cães e gatos saudáveis e com doença renal (GRAUER, 2022).

É essencial que os glomérulos funcionem como filtros para retenção de proteínas, sendo essa conservação necessária para a regulação da pressão oncótica, coagulação sanguínea e outros processos vitais. Em indivíduos saudáveis, essa pequena quantidade de proteínas que chega ao filtrado glomerular é quase totalmente reabsorvida pelos túbulos proximais. Devido à barreira representada pelos poros capilares, proteínas com peso molecular maior que 60.000 a 65.000 dáltons não devem estar presentes em grandes quantidades no filtrado glomerular normal (SANTOS et al., 2001; DIBARTOLA, 2004; GRAUER, 2010; HARLEY e LANGSTON, 2012).

A urina de cães e gatos saudáveis contém apenas uma pequena quantidade de albumina (< 1 mg/dl) e outras proteínas. O colágeno tipo IV dentro da membrana basal da parede capilar glomerular restringe a filtração da maioria das proteínas plasmáticas, principalmente com base no peso e tamanho molecular. Albumina (peso molecular 69.000 daltons) e proteínas maiores normalmente não estão presentes em grandes

quantidades no filtrado glomerular devido a essa permeabilidade seletiva glomerular. A parede capilar glomerular carregada negativamente impede ainda mais a passagem de proteínas carregadas negativamente como a albumina. O filtrado glomerular inicial de cães e gatos saudáveis contém apenas 2-3 mg/dl de albumina em comparação com cerca de 4 g/dl encontrados no plasma. Proteínas de menor peso molecular, assim como aquelas proteínas maiores carregadas positivamente que passam através da parede capilar glomerular, são quase completamente reabsorvidas pelas células epiteliais tubulares. Essas proteínas reabsorvidas podem ser quebradas e usadas pelas células epiteliais ou devolvidas ao plasma como seus aminoácidos constituintes. Essa reabsorção ocorre principalmente nos túbulos contorcidos proximais e reduz a concentração de albumina na urina normal para  $< 1$  mg/dl (GRAUER, 2022).

Portanto a proteinúria em cães e gatos com DRC pode ocorrer devido a lesões glomerulares e/ou tubulares. A proteinúria tubular ocorre quando a reabsorção tubular de proteína do filtrado glomerular está comprometida. A proteinúria tubular é tipicamente de menor magnitude em comparação com a proteinúria glomerular (GRAUER, 2019).

A detecção de proteinúria pode ser realizada usando a razão proteína/creatinina na urina (RPC), que é um teste laboratorial indicado para avaliação de lesão glomerular quando ainda não há evidências clínicas de patologia no sistema urinário. Método quantitativo, simples e rápido obtido a partir da divisão da concentração de proteínas pela concentração de creatinina em amostra de urina. Enquanto os níveis de creatinina e ureia sanguíneos somente se elevam quando 75% ou mais dos néfrons estiverem lesados, a RPC aumenta a partir de 25% de comprometimento ao tecido renal, possibilitando assim um diagnóstico de DRC mais precoce. Sendo assim, a proteinúria renal além de ser um marcador da gravidade da doença renal, também pode ser monitorada em relação à progressão da DRC e assim, fornecer um prognóstico (CHEW et al., 2011; TRIPATHI et al., 2011).

No subestadiamento da DRC a proteinúria deve ser de origem renal, descartando causas pré-renais e pós-renais. A classificação do subestádio como não proteinúrico, proteinúrico limítrofe ou proteinúrico baseia-se na RPC sugerido pela IRIS (GRAUER, 2022) (**Tabela 02**):

**Tabela 02. Subestádio da DRC baseado na proteinúria em cães e gatos**

<b>Biomarcador Renal</b>	<b>Espécie</b>	<b>Não Proteinúrico</b>	<b>Proteinúria limítrofe</b>	<b>Proteinúrico</b>
<b>Razão RPC</b>	Cães	<0,2	0,2-0,5	<0,5
	Gatos	<0,2	0,2-0,4	<0,4

Fonte: Adaptado GRAUER, 2022; IRIS, 2023.

Disponível: [http://iris-kidney.com/pdf/2\\_IRIS\\_Staging\\_of\\_CKD\\_2023.pdf](http://iris-kidney.com/pdf/2_IRIS_Staging_of_CKD_2023.pdf)

Como a proteinúria persistente é considerada mais provável de ser significativa do que a proteinúria transitória, o subestadiamento idealmente deve exigir que a persistência da proteinúria seja demonstrada em três ou mais amostras de urina coletadas durante um período de pelo menos duas semanas (ELLIOTT e WHITE, 2019).

A urinálise (EAS) pode ser dividida em três partes: exame físico, químico e a análise de sedimento. Outra forma de avaliarmos proteinúria é pelo exame químico na urinálise com o auxílio de fitas reagentes, onde a concentração de proteínas é dada em mg/dL (NAVARRO, 1996; THRALL, 2015).

#### **2.4.2. Pressão Arterial Sistólica (PAS)**

A pressão arterial (PA) consiste em uma ferramenta importante e indispensável na medicina veterinária. A PA pode ser medida diretamente por meio de cateterismo intra-arterial ou indiretamente por meio de dispositivos não invasivos que incorporam um manguito de compressão colocado em um membro ou na base da cauda. A medição invasiva da PA é reconhecida como o padrão-ouro; no entanto, esse método não é utilizado na rotina clínica veterinária, principalmente por ser desconfortável ao paciente. As medidas indiretas de PA comumente utilizadas são não invasivas e incluem aparelhos como esfigmomanometria ultrassônica Doppler ou oscilometria (BRANSON; WAGNER-MANN; MANN, 1997; BROWN et al., 2007; CERNA et al., 2021)

Na medição da PA, é importante seguir algumas recomendações para obter resultados confiáveis, a aferição deve ser realizada por profissional qualificado e experiente, a hipertensão situacional induzida por ansiedade, excitação ou estresse, conhecido também como “efeito do jaleco branco”, pode ser minimizada deixando o paciente em uma área tranquila, longe de outros animais, antes de outros procedimentos e quando estiverem mais relaxados. Outro fator importante é a escolha

do manguito, o tamanho correto é fundamental para obter medições precisas, a largura do manguito deve ser de 30% a 40% da circunferência da extremidade no local de colocação do manguito. A primeira medição deve ser descartada e a média de 5-7 medições consecutivas deve ser obtida (ACIERNO et al., 2018; BELEW; BARLETT; BROWN, 1999; BINNS et al., 1995; GOUNI et al., 2015; MARINO et al., 2011).

A hipertensão sistêmica pode estar associada a estressores ambientais ou situacionais, ocorrer secundariamente a outras doenças ou drogas (hipertensão secundária) ou a outras causas potenciais não identificadas (hipertensão idiopática). A hipertensão secundária tem sido associada em cães e gatos a diversas situações clínicas, como doença renal, hiperadrenocorticismo (incluindo uso de glicocorticoides), hipertireoidismo, hipotireoidismo, diabetes mellitus, obesidade, feocromocitoma ou hiperaldosteronismo primário. A hipertensão idiopática é frequente em gatos mais velhos, mas também foi descrita em cães (BROWN e ROURA, 2022).

A doença renal pode afetar a regulação da pressão arterial, levando a uma pressão arterial inapropriadamente alta. A pressão arterial elevada pode ser prejudicial para os rins e pode danificar outros órgãos-alvo, como o coração (hipertrofia ventricular esquerda), o olho (hifema, retinopatia hipertensiva) e o cérebro (embotamento, letargia, convulsões), levando a sinais extra-renais e morbidade. A justificativa para o tratamento da hipertensão em cães e gatos é minimizar ou prevenir a lesão desses órgãos (ACIERNO et al., 2018; ELLIOTT e WHITE, 2019; BROWN e ROURA, 2022).

O subestadiamento da PA baseia-se na sua medição e na presença ou ameaça de lesão de órgão-alvo extra-renal. Tal como acontece com a proteinúria, a identificação da persistência da hipertensão deve ser baseada em múltiplas medições sequenciais da pressão arterial. Por outro lado, se já houver lesão de órgão-alvo extra-renal, a demonstração de persistência não é necessária e o tratamento deve ser iniciado imediatamente (ELLIOTT e WHITE, 2019).

A hipertensão pode estar presente em qualquer estágio da DRC pela IRIS, pois a concentração de creatinina no sangue não está diretamente correlacionada com a pressão arterial. Aproximadamente 20% dos animais com DRC são hipertensos no momento do diagnóstico inicial e um adicional de 10-20% dos animais inicialmente normotensos se tornarão hipertensos ao longo do tempo. A recomendação da IRIS é

que a pressão arterial sistólica (PAS) seja medida e o subestádio da DRC seja determinado usando os critérios mostrados na **Tabela 03** (ACIERNO et al., 2018; IRIS, 2019; BROWN e ROURA, 2022).

**Tabela 03. Subestádio da DRC baseado na pressão arterial sistólica em cães e gatos**

PAS (mmHg)	Subestádio da PAS	Risco de danos futuros em órgãos-alvo (TOD)
<140	Normotenso	Mínimo
140 - 159	Pré-hipertenso	Baixo
160 - 179	Hipertenso	Moderado
≥180	Hipertenso grave	Alto

Fonte: Adaptado ACIERNO et al., 2018; BROWN e ROURA, 2022; IRIS, 2023.

Disponível: [http://iris-kidney.com/pdf/2\\_IRIS\\_Staging\\_of\\_CKD\\_2023.pdf](http://iris-kidney.com/pdf/2_IRIS_Staging_of_CKD_2023.pdf)

Danos que resultam da presença de hipertensão arterial sustentada são referidos como dano de órgão-alvo (TOD). A avaliação inicial de um animal com suspeita de hipertensão sistêmica deve incluir o reconhecimento de condições que possam estar contribuindo para um aumento da PAS, identificando e caracterizando o TOD e determinando se há alguma condição concomitante aparentemente não relacionada que possa complicar a terapia anti-hipertensiva. Uma medida de PAS alta em um cão ou gato com DRC geralmente significa hipertensão sistêmica secundária a esta doença, porém a mesma deve descartar hipertensão situacional. Nos rins, a TOD geralmente se manifesta como uma progressão da doença renal, como aumento da taxa de declínio da função renal, mortalidade, aumento da frequência de crises urêmicas e/ou aumento da magnitude da proteinúria (BROWN e ROURA, 2022).

## 2.5 Método de ELISA com amostra de urina

A técnica de ELISA é um teste sorológico utilizado para diagnosticar a maioria das doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose. Embora a técnica seja sensível, sua especificidade depende do antígeno aplicado (FARAHMAND e NAHREVANIAN, 2016) e da amostra utilizada.

Atualmente vem se desenvolvendo pesquisas com o intuito de melhorar o desempenho da técnica de ELISA para o diagnóstico sorológico de LV, incluindo a análise de vários antígenos recombinantes. Para superar as limitações atuais dos métodos diagnósticos, é desejável uma estratégia alternativa que deve ter várias

características, incluindo ser não invasiva, precisa e viável. Várias amostras obtidas por métodos não invasivos podem ser utilizadas, como saliva, fluido oral, swab bucal ou urina, já relatados como amostras promissoras para o diagnóstico de leishmaniose visceral (ABEIJON e CAMPOS NETO, 2013; VALLUR et al., 2015). Dentre estas, amostras de urina em humanos vem demonstrando excelente desempenho no diagnóstico por ELISA com uso de antígeno recombinante (KHAN et al., 2010; ISLAM et al., 2012; SINGH et al., 2013).

O ELISA com urina é um método altamente sensível e específico para detecção quantitativa de anticorpos em doenças parasitárias. Além disso, a urina é mais aceitável para sua coleta, principalmente de indivíduos com infecção subclínica (NAGAOKA et al., 2021). SOLANO-GALLEGO et al. (2003) descreveram pela primeira vez a presença de IgG na urina de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, correlacionaram sua presença com as concentrações séricas de IgG e com a intensidade das lesões renais. Apesar da origem da imunoglobulina ter sido principalmente sistêmica em decorrência das lesões renais, os autores sugeriram que, ainda que em menor extensão, possa ocorrer produção local de imunoglobulinas.

A urina contém muito menos proteínas do hospedeiro do que o plasma ou soro, portanto, pequenas quantidades de moléculas de organismos estranhos presentes nesta excreção são muito mais prováveis de serem identificadas por espectrometria de massa do que no sangue. A urina é uma das amostras mais fáceis e menos invasivas que podem ser coletadas de um paciente humano. A presença de anticorpos excretados na urina pode ser detectável mais cedo do que a detecção do próprio patógeno em órgãos-alvo da doença (CAMPOS NETO e ABEIJON, 2020).

## **2.6 Ultrassonografia**

O uso da ultrassonografia (USG) surgiu para complementar outras formas de diagnóstico, tornando cada vez mais fácil, rápido e preciso a chegada ao diagnóstico definitivo. A ultrassonografia é um método de diagnóstico por imagem bastante importante na medicina veterinária que fornece informações em tempo real da arquitetura dos órgãos abdominais e pélvicos (PEIXOTO et al., 2010; SEOSANE et al., 2011). Na suspeita de alterações renais a ultrassonografia é um método crucial, um dos primeiros exames a ser realizado para avaliação renal, por ser um método que nos

possibilita obter informações quanto a posição topográfica, dimensões, forma, arquitetura interna ou ainda detectar algum outro tipo de alteração no órgão, e identifica de forma precoce o comprometimento renal, modalidade essa realizada de forma não invasiva e indolor, podendo sugerir a existência de nefropatias (CARVALHO, 2014; PEREIRA et al., 2019).

Na ultrassonografia convencional, modo-B (modo brilho ou escala cinza), a intensidade do eco é visualizada como um ponto brilhoso na tela do aparelho formando imagens com diferentes intensidades de brilho em escala de cinza e com diversas ecogenicidades. Os sinais de eco detectados, são processados e convertidos em luminância, na dependência principalmente da forma e da densidade das estruturas avaliadas, as ondas de ultrassom podem, resumidamente, atravessar, refletir ou atenuar. Estruturas que refletem as ondas de ultrassom (ecogênicas) são representadas através de uma escala de cinza, tanto mais clara quanto maior for à intensidade da onda refletida. Estruturas examinadas que não refletem as ondas de ultrassom (anecoicas) são representadas em preto. É o método mais utilizado, pois possibilita a formação de imagens ultrassonográficas renais com ótima visualização da dimensão, forma, arquitetura e contornos (KEALY, 2012; PIXEL, 2016).

Na avaliação normal dos rins no exame ultrassonográfico, a margem externa deve mostrar uma cápsula hiperecoica lisa e claramente definida e o rim deve ser simétrico e oval ou em forma de feijão. Três regiões distintas devem ser identificadas: o córtex renal, a medula renal e o seio renal. A definição corticomedular é vista como uma interface claramente definida entre o córtex hiperecoico e a medula mais hipoecoica. O seio renal é a estrutura mais hiperecoica dentro do rim, devido à presença de gordura, que circunda a pelve renal e ramos vasculares que entram no parênquima renal. Os divertículos pélvicos renais vazios e os vasos interlobares e arqueados são vistos como estruturas hiperecogênicas regularmente espaçadas que cruzam o parênquima renal de ecogenicidade semelhante ao seio renal. O córtex renal deve se apresentar hipoecogênico ao parênquima esplênico, e hipoecogênico ou isoecogênico ao parênquima hepático, sendo que a cápsula e divertículos são hiperecogênicos (PENNINGCK e D'ANJOU, 2011; COLE et al., 2021).

Para avaliação da pelve renal, as imagens transversais são preferidas, usando a crista renal como ponto de referência para identificar a estrutura em forma de V adjacente. O tamanho da pelve é determinado medindo-se desde a crista renal até o

início do ureter. Dilatação leve com líquido anecoico pode ocorrer em pacientes com função renal normal, até aproximadamente 3 mm, mas o ureter proximal geralmente não é identificado em normalidade. Ao avaliar o tamanho renal, geralmente são usadas medidas de eixo longo (COLE et al., 2021).

Nos rins é possível avaliar o comprimento renal, que é dependente do peso do animal, e a mensuração do tamanho renal é obtido a partir da relação entre o comprimento dos rins dividido pelo diâmetro luminal da aorta (BARR et al., 1990). Deve-se ainda observar a simetria entre os rins, se os contornos estão regulares ou irregulares, se há definição da região cortical e medular e a manutenção da relação 1:1 entre elas (PENNINCK e D'ANJOU, 2011).

O aumento da ecogenicidade renal é um dos achados mais comuns em cães e gatos com doença renal, e doenças como nefrites intersticiais, glomerulares e necrose tubular aguda podem gerar essa alteração ultrassonográfica. A hiperecogenicidade difusa renal pode estar associada com a perda da definição corticomedular, alteração já descrita em pacientes com doença renal, sendo que estes também apresentam redução nas dimensões e contornos irregulares (PENNINCK e D'ANJOU, 2011).

A bexiga normal deve ter parede lisa e uniforme e conteúdo anecoico. A espessura da parede depende da distensão da bexiga. Em cães e gatos, a espessura da parede não deve exceder 3,0 mm e 1,7 mm, respectivamente. O conteúdo da vesícula urinária geralmente é anecoico, mas fatores relacionados ao paciente ou relacionados a artefatos de imagem podem alterar essa aparência em animais normais. A uretra proximal é frequentemente identificada como uma estrutura tubular que se estende caudalmente a partir do colo vesical, geralmente vazia de líquido (COLE et al., 2021).

Até o momento, na medicina veterinária os estudos realizados não foram capazes de descrever detalhadamente as alterações ultrassonográficas renais em cães com leishmaniose (ABDALLA et al., 2014). Onde a pouca literatura encontrada mostrou hiperecogenicidade de cortical, perda da definição e relação córtex-medular, sendo que a cortical se torna espessa e os contornos irregulares, e presença de pontos hiperecogênicos nas regiões de divertículos caracterizando mineralizações distróficas, e que quando comparamos modo B e Doppler, o Doppler é a ferramenta que melhora a capacidade diagnóstica da ultrassonografia renal, método válido para avaliar e detectar alterações de fluxo em processos patológicos renais com lesão vascular renal, como no caso da leishmaniose, e pode auxiliar no diagnóstico de animais com essa



infecção (BALTAZAR et al., 2016; OLIVEIRA, 2018). Em cães com DRC achados comuns são hipoplasia renal, aumento difuso da ecogenicidade e diminuição da definição córtico- medular (POLLARD e PHILLIPS, 2017). Portanto, as alterações ultrassonográficas observadas na Leishmaniose Canina são semelhantes às identificadas ultrassonograficamente nas DRC (PENNINCK e D'ANJOU, 2011).

As alterações ultrassonográficas detectadas por meio do modo B do rim, por si só, não possibilitam uma caracterização de qual doença está acometendo o órgão, pois doenças glomerulares com perda de proteína, glomerulonefrites e amiloidose renal não são distinguíveis de outras desordens difusas renais. O processo de remodelamento renal envolve a substituição do parênquima lesionado por fibrose causando distorção da arquitetura e contornos irregulares (NYLAND et al., 2015). Outras observações são vistas em exames ultrassonográficos dos rins, como é o caso a banda da medular e/ou sinal medular (CORDELLA et al., 2020).

O sinal da medular é uma linha ou halo hiperecogênico, caracterizado a ultrassonografia, na margem externa da camada medular, paralela a junção córtico-medular. Foi descrita em cães com doença renal aguda e crônica, incluindo nefropatia hipercalcêmica, nefrite intersticial crônica, nefrose tubular aguda e ainda em cães sem indícios de disfunção renal. Em gatos, correlaciona-se com vasculite piogranulomatosa devido a PIF e nefrite intersticial crônica, apesar de também ser encontrada em gatos saudáveis de todas as raças (ADAMS et al., 1989; BARR et al., 1989; ADAMS et al., 1991; BILLER et al., 1992; MANTIS et al., 2000; PAEPE et al., 2013). A hiperecogenicidade de cortical renal e sinal da medular não podem ser considerados marcadores precisos de doença renal, por ser um achado inespecífico, entretanto pode ser sugestivo. Dessa forma, os resultados ultrassonográficos devem ser correlacionados com achados clínicos e laboratoriais para investigar a significância clínica (VAC, 2004).

O trato urinário inferior é composto pela bexiga e pela uretra e tem a função de armazenamento e eliminação da urina. As doenças que acometem o trato urinário inferior são frequentes em cães e gatos domésticos, sendo a cistite bacteriana a mais comum (40%), seguida da incontinência urinária (24%) e da urolitíase (18%), dentre outras (LULICH et al. 2008; GUERRA, 2018). Os sinais clínicos de doença do trato urinário inferior em cães são característicos, mas não específicos para infecção (SORENSEN et al., 2019).

Em caso de suspeita de infecção do trato urinário (ITU), o diagnóstico definitivo requer cultura bacteriológica de urina ou tecido urinário. A cistocentese é o método de coleta recomendado para amostras a serem cultivadas, pois este método contorna a uretra distal, que é habitada por bactérias comensais mesmo em cães saudáveis. A urocultura com teste de suscetibilidade é recomendada para discriminar a infecção de doenças não infecciosas que mimetizam a ITU, direcionando assim o tratamento ideal e promovendo o manejo antimicrobiano (LING & RUBY, 1978; WEESE et al., 2019).

As cistites são as doenças que mais acometem a vesícula urinária, causando alterações ultrassonográficas como assimetria e espessamento de parede, principalmente na porção cranial (LANG, 2006), permite avaliar a parede vesical e seu conteúdo, o que é de grande valor para as causas não infecciosas de cistite, como inflamações, neoplasias ou traumas, evitando uso desnecessário de antibióticos. (RIBEIRO, 2011; KOGIKA & WAKI, 2015). Poci et al. (1998) relataram a ocorrência de cistite crônica em cães diagnosticados com leishmaniose visceral.

Os urólitos, comumente vistos em cães, são do tipo estruvita e oxalato de cálcio (OYAFUSO et al., 2010). Cálculos urinários de xantina são pouco frequente nos cães (SOSNAR et al., 2005) e ocorrem mais em machos (VRABELOVA et al., 2011), do tipo raro e insolúvel (RADITIC, 2015). A presença de urólitos em cães com leishmaniose está mais relacionada ao uso do alopurinol, pois ele inibe a conversão de xantina em ácido úrico, no entanto, é importante lembrar que a xantina também pode se precipitar e formar urólitos, formando o cálculo de xantina, presente quando há deficiência da enzima xantina oxidase ou em decorrência do uso prolongado de alopurinol levando a alta concentração de xantina (KOEHLER et al., 2008; OSBORNE et al., 2008; ULRICH et al., 2008).

## **2.7 Glomerulonefrite**

O termo glomerulonefrite (GN) abrange uma variedade de distúrbios imunomediados que causam inflamação no glomérulo e outros compartimentos do rim. Estudos mostraram a interação crucial entre as células inflamatórias derivadas da medula óssea e as células intrínsecas do rim, que é fundamental e única para a patogênese da glomerulonefrite (CHADBAN e ATKINS, 2005). A infecção por

muitos patógenos pode desencadear uma resposta imune que resulta em lesão glomerular (MOHAMMAD e BARACCO, 2020). As glomerulonefrites são doenças renais com morbidade e mortalidade substanciais, difíceis de tratar, às vezes sem cura, e podem levar à DRC e à doença renal terminal (ALYOUSEF et al., 2020).

As lesões renais associadas à infecção por leishmaniose visceral nos cães são decorrentes do depósito de imunocomplexos nos glomérulos e por ativação do complemento, causando normalmente a morte do animal por glomerulonefrites (FERRER, 1992). Os imunocomplexos são formados pela combinação de anticorpos com os antígenos. Após haver a deposição dos imunocomplexos nas paredes dos capilares glomerulares é que ocorre a ativação do complemento, a infiltração de neutrófilos, a agregação plaquetária, ativação da cascata de coagulação e deposição de fibrina. Os neutrófilos podem então liberar substâncias oxidantes e enzimas, causando destruição tecidual e inflamação aguda. Quando os imunocomplexos são depositados nos glomérulos, causam espessamento da membrana basal e estimulam a proliferação das células glomerulares (células epiteliais, células endoteliais e células mesangiais e, eventualmente, hialinização e esclerose (NELSON & COUTO, 2010; TIZARD, 2014).

A presença de lesão por imunocomplexos nos glomérulos estimula células como os neutrófilos, células mesangiais, macrófagos e plaquetas a liberarem tromboxanos, óxido nítrico e fator ativador de plaquetas. Tais substâncias aumentam a permeabilidade da membrana basal a macromoléculas; como resultado as proteínas plasmáticas, especialmente a albumina, são perdidas na urina e essa perda intensa excede a capacidade do organismo em sintetizar a proteína. Como resultado, a concentração de albumina diminui, conseqüentemente cai a pressão oncótica plasmática acarretando diminuição do volume sanguíneo e queda do fluxo renal. Ao passo que avança a doença renal, diminui a taxa da filtração glomerular ocasionando elevação da ureia e da creatinina sérica, uma vez que a creatinina não é metabolizada e é excretada quase que inteiramente pela filtração glomerular (TIZARD, 2014).

A classificação e nomenclatura atual para a doença glomerular canina tem sido baseada no sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde criado para definir e padronizar as categorias de doença glomerular humana (COWGILL e POLZIN, 2013; CIANCIOLO et al., 2016). Embora as doenças glomerulares caninas compartilhem muitas das características estruturais observadas em suas contrapartes humanas, também existem diferenças marcantes (CIANCIOLO et al., 2016).

Em 2005, um encontro internacional de nefrologistas e nefropatologistas veterinários convocou a International Veterinary Renal Pathology Initiative em Holanda, para desenvolver uma visão para caracterizar com mais precisão a patologia glomerular canina. O projeto de padronização renal da associação mundial de veterinários de pequenos animais (WSAVA RSP) focou na possibilidade de que a doença glomerular canina possa ser definida e classificada com mais precisão com base tanto nas características morfológicas (microscopia de luz, eletrônica e imunofluorescência) quanto nos padrões da resposta clínica e patológica clínica ao insulto glomerular (COWGILL E POLZIN, 2013).

Este grupo internacional de nefrologistas e patologistas veterinários planejou um estudo que desenvolveria uma compreensão abrangente da doença glomerular em cães, usando rotineiramente métodos padronizados de microscopia de luz, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão para avaliar biópsias renais e associando os achados patológicos com análises clínicas e dados do caso (CIANCILOLO et al., 2016).

As principais doenças glomerulares em cães e gatos podem ser classificadas como amiloidose, glomerulonefrite imunomediada e não imunomediada (CIANCILOLO et al., 2013). Os critérios de classificação das glomerulopatias e glomerulonefrites pela Organização Mundial de Saúde são: glomerulopatia com alterações mínimas; glomeruloesclerose segmentar focal; glomerulonefrite membranoproliferativa; glomerulonefrite proliferativa mesangial; glomerulonefrite membranosa; glomerulonefrite crescêntica; glomerulonefrite crônica (CHURG et al., 1985; JONES et al., 2000).

Alguns achados apontaram como a provável causa da patologia renal uma deposição de complexos antígeno/anticorpo nas estruturas renais e ao intenso infiltrado inflamatório plasmocitário (MACHADO et al., 2007). Deposição de imunocomplexos ao longo da membrana basal glomerular e tubular eventualmente resultava em glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial, o que podia levar à uma insuficiência renal; sendo essa, muitas vezes, a principal causa de morte em cães com Leishmaniose (SILVA, 2007, BANETH et al., 2008). A glomerulonefrite secundária a leishmaniose visceral indica que os cães podem apresentar proteinúria discreta à moderada sem quaisquer manifestações clínicas desses pacientes (GRAUER, 2005; LESS et al., 2005; VADEN, 2011).

### 3. CAPÍTULO I\*

---

\* Artigo elaborado de acordo com as normas do periódico “**Plos One**” (Qualis A1, Fator de Impacto: 3.752).

## Renal alterations in dogs infected with *Leishmania infantum* treated with allopurinol and immunochemotherapy

Luana Dias Moura <sup>a</sup>, Leopoldo Fabricio Marçal Nascimento <sup>a</sup>, Dayane Francisca Higino Miranda <sup>b</sup>, Flaviane Alvez Pinho <sup>c</sup>, Ingrid dos Santos Farias <sup>a</sup>, Kellen Matuzzy Silva Melo <sup>a</sup>, Jackellyne Geórgia Dutra e Silva Leite <sup>a</sup>, Guilherme Loureiro Werneck <sup>d</sup>, Steven G. Reed <sup>e,f</sup>, Malcom S. Duthie <sup>e,f</sup>, Aldina Barral <sup>g,h</sup>, Manoel Barral-Neto <sup>g,h</sup>, Leandro Zuccolotto Crivellenti <sup>i</sup>, Maria do Socorro Pires e Cruz <sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Universidade Federal do Piauí (UFPI), Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco, Teresina, PI, Brazil.

<sup>b</sup> Universidade Federal do Piauí, Departamento de Zootecnia Veterinária, Teresina, PI, Brazil.

<sup>c</sup> Universidade Federal da Bahia, Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas Veterinária, Salvador, BA, Brazil.

<sup>d</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Estudos em Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>e</sup> Infectious Diseases Research Institute, Seattle, WA 98102, USA

<sup>f</sup> HDT Biotech Corporation, Seattle, WA 98102, USA

<sup>g</sup> Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, BA, Brazil

<sup>h</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Instituto de Investigação em Imunologia, São Paulo, SP, Brazil

<sup>i</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Clínica de Pequeno Animais, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

Autora para correspondência: Email: [ldmoura18@gmail.com](mailto:ldmoura18@gmail.com)

### Abstract

Canine leishmaniasis in Brazil is caused by *Leishmania infantum* and is transmitted by sandflies, *Lutzomyia longipalpis* and *L. cruzi*. Chronic kidney disease (CKD) can be one of the leading causes of death in domestic dogs. The therapy is still failing, the induction of treatment with immunomodulation, immunotherapy or immunochemotherapy has been gaining prominence in studies, as promising approaches to control the disease. The objective of this work was to evaluate renal parameters in dogs with leishmaniasis manifested by immunochemotherapy, followed for 360 days. The samples used came from a previous experiment developed in Teresina-PI, at the Animal Experimentation Kennel of the Federal University of Piauí. Randomized study with 28 dogs, divided into: Group 1 with 6 dogs that did not take medication, Group 2 with 8 dogs that received allopurinol in monotherapy for 90 days and Group 3 with 8 dogs that were immunized with the Leish-F2 + SLA formulation - SE and allopurinol for 90 days. Ultrasound exams focused on renal evaluation, urine sample for detection of proteinuria were analyzed by neurological protein/creatinine ratio (RPC), urinalysis (EAS) and standard ELISA with SLA, as well as renal histopathology. Statistics were with total and individual values, in percentage, mean, standard deviation, median, mixed linear model and analysis with GraphPad Prism 8.0 software. The renal medullary ultrasound signal appeared and was received in dogs that did not receive therapy and in dogs that received only allopurinol, unlike the group that received immunochemotherapy, which delayed the appearance of this finding during the 360 days of follow-up. Dystrophic renal mineralization was more evident in groups of dogs that received allopurinol in monotherapy or in immunochemotherapy. The detection of protein in urine as a biomarker of kidney damage was more sensitive by ELISA and had similar results seen in EAS than by RPC in the evaluated groups. Dogs without treatment showed increased levels of intoxication and the allopurinol group felt the symptoms only during the period of drug use and immunochemotherapy was able to reduce the levels of dependence in the urine and sustain the low levels during the waiting times for the ELISA test. In the renal

histopathology of the treated and untreated dogs, alterations, both glomerular and tubulointerstitial, and dogs that were not treated had a greater predominance of tubulointerstitial nephritis and glomerulosclerosis, which can lead to renal failure. We conclude that dogs with leishmaniasis predisposed to develop CKD can obtain nephroprotection when they receive immunochemotherapy with allopurinol associated with Leish-F2 + SLA-SE immunization.

**Keywords:** dog, kala-azar, immunochemotherapy, kidney disease.

## 1. Introdução

A leishmaniose se encontra entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (DESJEUX et al., 2004; WHO, 2022), importante complexo de doenças transmitidas por vetores de protozoários que afetam humanos e animais (TABBABI, 2019). Nas Américas a doença já foi descrita em pelo menos em 12 países, sendo que 97% dos casos de ocorrência no Brasil (WHO, 2022). A leishmaniose canina é causada por *Leishmania infantum* e é transmitida por flebotomíneos, ocorrendo no Brasil as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi* (ALVAR et al., 2006; MISSAWA & LIMA, 2006; BRITO et al., 2014). Os sinais clínicos mais frequentes em cães com leishmaniose visceral podem diferir de um cão para outro, ditos os mais frequentes a linfadenopatia, lesões do focinho ou orelha (úlceras), apatia, anorexia, mucosas pálidas, onicogribose, lesões cutâneas, hemorragia, despigmentação do focinho ou lábio, alopecia, blefarite e ceratoconjuntivite (REIS et al., 2006, SILVA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018).

A leishmaniose canina leva ao comprometimento de múltiplos órgãos. Os cães que manifestam sinais clínicos geralmente apresentam títulos elevados de anticorpos na sorologia, enquanto títulos baixos predominam em cães infectados imunologicamente resistentes ou em cães expostos sem confirmação do parasita (PALTRINIERI et al., 2016). Os sinais clínicos e a titulação elevada desses anticorpos estão relacionadas a uma resposta celular ineficiente e uma resposta humoral exacerbada, formando complexos imunes que se depositam nos órgãos, como os rins. A deposição de imunocomplexos nos glomérulos causa lesão renal e por conta disso o cão apresenta proteinúria, a glomerulonefrite é a principal lesão observada na CanL, no entanto, outros tipos de lesões podem estar presentes. Em cães com CanL e em tratamento, a função renal e as variáveis de resposta inflamatória/imune devem ser monitoradas periodicamente (ZATELLI et al., 2003; BARBIERI, 2006; TEIXEIRA NETO et al., 2010; COSTA et al., 2013; PALTRINIERI et al., 2016).

A doença renal crônica (DRC) em cães com leishmaniose é uma das principais causas de morte em cães acometidos (POLI et al., 1991; SOLANO-GALLEGO et al., 2009), uma vez que nos estádios mais avançados da leishmaniose encontramos níveis altos de imunocomplexos que se depositam nos rins, levando a glomerulonefrite, podendo estar presente desde uma proteinúria subclínica à síndrome nefrótica grave ou doença renal crônica em estágio terminal, caracterizando prognóstico ruim e risco de óbito (BENDERITTER et al., 1988; PLEVRAKI et al., 2006; PALTRINIERI et al., 2016; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; LEISHVET, 2022).

Na terapêutica para CanL no Brasil podemos citar drogas leishmanicidas ou leishmanistáticos que atuam com foco na redução da carga parasitária e melhora clínica, e uso de imunomoduladores que agem estimulando a resposta imune no cão. Entretanto a terapia ainda é um desafio, em decorrência de não existir cura parasitológica (GUARGA et al., 2002; GÓMEZ-OCHOA et al. 2009; MIRÓ et al., 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; GIUNCHETTI et al., 2019). Portanto alternativas como imunoterapia ou imunoquimioterapia são promissoras na busca por uma terapêutica mais precisa no controle clínico e parasitológico da CanL, que induza resposta imune celular potente ao ponto de controlar e interromper a infecção em cães (BAXARIAS et al., 2019).

Uma vacina promissora que vem sendo estudada para imunoterapia na CanL é a de antígeno de poliproteína recombinante Leish-111f, conhecida também como Leish-F1, formulado com monofosforil lipídeo A em emulsão estável (MPL-SE) (TRIGO et al., 2010). MPL-SE serve como um adjuvante eficaz para induzir respostas protetoras Th1 (REED et al., 2003), atividade imunoestimuladora do MPL como um ligante de Toll-like receptor 4 (TLR4) que ativa diretamente as células nas vias de resposta imune inata e, pode estimular uma atividade anti-parasita, e resposta imune adaptativa (TRIGO et al., 2010).

Logo a Leish-F1 evoluiu para a Leish-F2, que é a vacina modificada a partir da proteína de fusão Leish-111f, formulada com o receptor TLR4, agonista Adjuvante Lipídico de Segunda Geração (SLA) em emulsão estável (SE; SLA-SE) (NASCIMENTO et al., 2020). Os adjuvantes são usados para ajudar o antígeno a desencadear uma resposta imune rápida, intensa e duradoura (Nascimento et al., 2018). Um estudo recente no Brasil mostrou a possibilidade de obtenção na melhora clínica e remissão da carga parasitária em cães submetidos a imunoquimioterapia, associação de alopurinol e imunoterapia com a vacina Leish-F2 + SLA-SE (NASCIMENTO et al., 2020).



O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros renais de cães com leishmaniose sem terapêutica, com terapêutica e submetidos a imunoterapia, através do monitoramento via ultrassom abdominal, exames laboratoriais, na detecção de proteinúria na urina pela razão proteína/creatinina (RPC), urinálise e pelo método de ELISA padrão com SLA, bem como avaliação histopatológica renal, no intuito de identificar alterações precoces de lesão renal, direcionadas a enfermidade, e avaliar o desempenho renal desses cães durante 360 dias.

## **2. Materiais e Métodos**

### **Declaração de ética**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) com parecer nº 093/15.

### **Primeiro ensaio e amostras do estudo**

Neste estudo as amostras utilizadas foram obtidas de um experimento realizado em 2018, já publicado (NASCIMENTO et al., 2020) (em anexo), ensaio desenvolvido em Teresina-PI, nas instalações do Canil de Experimentação Animal e no Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro de Ciências Agrárias (CCA) do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí (HVU/UFPI).

Os cães com e sem raça definida, naturalmente infectados por *L. infantum*, foram obtidos da Gerência de Zoonoses da Fundação Municipal de Saúde de Teresina, Piauí e do HVU/UFPI e incluídos no experimento com base na identificação positiva em exame parasitológico (exame direto) com detecção de formas amastigotas de *Leishmania sp* em amostras de aspirados de linfonodo, pele e/ou medula óssea, foi realizado diagnóstico diferencial para Erliquiose canina (Alere Erliquiose Ac test KIT®) e Cinomose canina (Alere Cinomose Ag test kit®, São Paulo, Brasil) e excluídos aqueles positivos para essas enfermidades. Os cães foram vermifugados (Dauverm Plus, Vansil®) e vacinados (Vanguard HTLP 5/CV-L; Pfizer Animal Health, Nova York, EUA) antes de serem introduzidos no experimento, e após o alojamento água e ração premium era fornecido aos cães, seguindo as demais orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

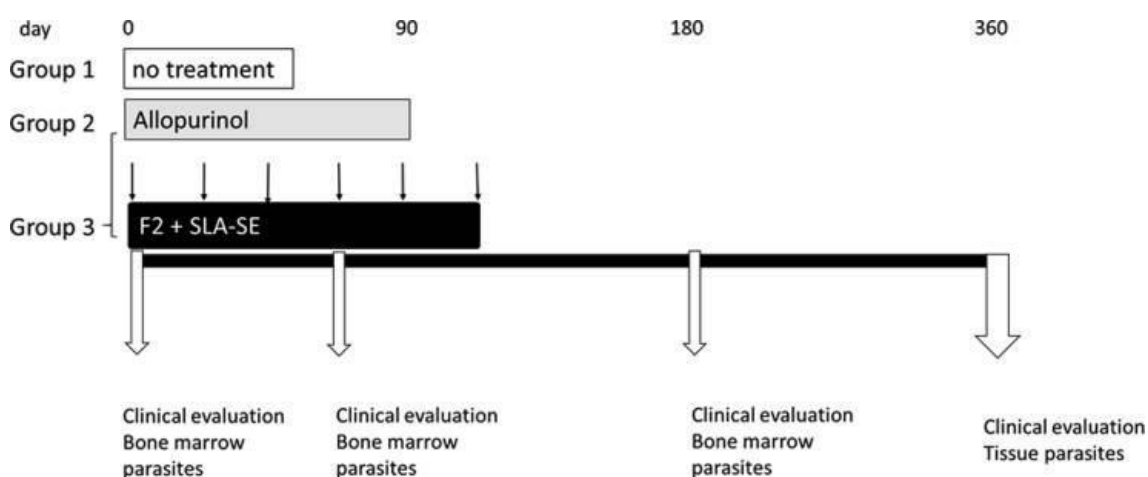
No primeiro ensaio a análise foi realizada nos tempos 0, 63, 90, 180 e 360 dias, que incluía escore clínico dos animais, pontuação atribuída a partir dos sinais clínicos presente

no cão e avaliação da carga parasitária em órgãos, com ênfase na medula óssea, comparando os resultados dessas análises entre os grupos.

As amostras que compõem o estudo atual, incluem amostras de urina para urinálise, análise da razão proteína/creatinina urinária (RPC) e detecção de IgG pela técnica de ELISA, imagens ultrassonográficas com foco na avaliação renal, exames laboratoriais, bem como histopatológico dos rins.

### Grupos dos animais

Estudo randomizado com base nas variáveis da carga parasitaria por medula óssea e escore clínico, quatro extratos foram criados com base nas duas variáveis e os animais foram alocados aleatoriamente para um grupo de tratamento, grupos formados com o mesmo perfil de carga parasitaria para garantir a comparabilidade entre eles (NASCIMENTO et al., 2020), distribuindo assim 22 cães em três grupos experimentais, Grupo 1 composto por 6 cães que não receberam medicação, Grupo 2 composto por 8 cães que receberam alopurinol em monoterapia por via oral na dose 20mg/kg, uma vez ao dia, durante 90 dias, e o Grupo 3 composto por 8 cães que foram imunizados por injeções subcutâneas com a formulação Leish-F2 + SLA-SE (20 µg cada) (Leish-F2 lote WR823-1370, SLA-SE lote #QG307; ambos IDRI), ao total de 6 doses, com intervalo de 21 dias entre cada dose, e receberam também a terapêutica com alopurinol na mesma posologia do grupo 2 (**Figura 01**).



**Figura 01.** Grupos experimentais que receberam avaliação clínica e quantificação da carga parasitaria em medula óssea. Grupo 1: não recebeu terapêutica. Grupo 2: recebeu terapêutica com alopurinol. Grupo 3 recebeu imunoterapia, imunização com uso do alopurinol.

Fonte: NASCIMENTO et al., 2020.

Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6928333/>

### **Tempo de avaliação dos exames**

Os exames ultrassonográficos e laboratoriais foram realizados e laudados nos tempos 0, 63, 120 e 360 dias, as amostras de urina para urinálise e razão proteína/creatinina urinária (RPC), bem como o ensaio imunoenzimático (ELISA) foram processados com as amostras dos tempos 0, 120 e 360 dias do experimento.

A análises de histopatológico renal foram realizadas ao final do experimento aos 360 dias do estudo após protocolo de eutanásia dos cães (NASCIMENTO et al., 2020), amostras coletadas dos três grupos, com tratamento e sem tratamento.

### **Ultrassom Abdominal**

O equipamento de ultrassom abdominal utilizado foi com o transdutor linear LN5-12/40 e transdutor micro-convexo CN4-9, em aparelho de Ultrassom Medison SonoAce R3 em Modo-B, e os exames realizados pelo programa de residência HVU/UFPI.

### **Coleta de Urina**

As coletas de urinas foram realizadas por cistocentese guiadas pela ultrassom para realização em laboratório dos exames de urinálise, em média de 1000 microlitros dessa urina foi aliquoteada em eppendorf de 2000 microlitros contendo 0,3 mol/l de azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) para melhor conservação das amostras, e essas armazenadas em freezer -80, e posteriormente foi realizado com essas amostras conservadas análise da razão proteína/creatinina urinária (RPC) e o ensaio de ELISA.

### **Urinálise e RPC**

A técnica da urinálise foi realizada por análise padrão (THRALL et al., 2015). Para a detecção de proteinúria foi realizado a razão proteína/creatinina na urina (RPC), método quantitativo e simples, com a utilização do kit da Bioclin BIOPROT U/LCR (segundo recomendações do fabricante) por espectrofotômetro semiautomático SX 160.

### **Detecção de Anticorpos IgG em Amostra de Urina pelo método de ELISA**

A detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* foi realizada com o kit ELISA de acordo com as recomendações do fabricante (EIE - Bio-Manguinhos®), que utiliza o antígeno solúvel de *Leishmania major*-like.

Para o desenvolvimento da técnica de ELISA foram utilizadas placas de 96 poços de poliestireno de superfície MaxiSorp™ (NUNC), previamente sensibilizadas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). Os controles positivo e negativo utilizados estavam presentes no kit.

Na etapa de diluição das amostras de eleição (soro) pelo kit, realizamos uma adaptação a partir de alguns protocolos na utilização de urina para o ensaio imunoenzimático (ISLAM et al. 2008; ISLAM et al. 2012; VALLUR et al. 2015; GHOSH et al. 2016). Em nosso estudo as amostras de urina foram adicionadas nos poços de placa já sensibilizada com SLA, em que foi adicionado 50 µl da urina pura, sem diluição da mesma, e incubados a 37° por 30 min. Após a incubação o conteúdo das placas foi desprezado e estas lavadas por quatro vezes com 200 µl por poço do tampão de lavagem (com H<sub>2</sub>O destilada).

Realizou-se nova incubação com o conjugado anti-IgG de cão marcado com peroxidase (Conjugado com diluente de amostra/conjugado diluído), adicionado 100 µl em cada poço e incubados a 37° por 30 min. Seguiram-se novamente etapas de lavagem descritas anteriormente. Ao final, foi utilizado a solução de revelação, contendo o substrato para a enzima presente no conjugado. Para a revelação das reações foi utilizado substrato (preparado com diluente do substrato com cromógeno TMB e substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e depois adicionou-se 100 µl em cada poço, ficou em temperatura ambiente, ao abrigo de luz, durante 10 min. A reação foi interrompida com solução de bloqueio (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M) com 50 µl por poço. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm, utilizando o software SolftMax Pro 5.0.

### **Histopatológico Renal**

Os dados de histopatológico renal foram obtidos ao final do experimento, a coleta de fragmentos de tecido renal foi realizada aos 360 dias do estudo após eutanásia dos cães, coletado dos três grupos do estudo, amostras com seis animais de cada grupo.

Para obtenção dos resultados foi desenvolvida técnica padrão, após o período adequado de fixação, com formol a 10%, os tecidos foram submetidos a exames histológicos de rotina.

## Análise Estatística

Os resultados de ultrassom, exames laboratoriais e histopatológico renal foram analisados com uma estatística descritiva, utilizando valores totais e individuais, explanados em porcentagem. Para análise de RPC foi utilizado mediana com percentil em avaliação não paramétrica e dados individuais através do modelo linear misto de medidas repetidas, com intercepto aleatório por indivíduo. A análise da urinálise (EAS) e do ELISA das urinas foi realizada com software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA).

## 3. Resultados

Na ultrassonografia convencional em modo-B realizada neste estudo, com foco no trato urinário superior e inferior, vimos que durante todo o acompanhamento os rins mantiveram a topografia habitual, seu formato preservado, dimensões simétricas e normais, arquitetura renal a relação corticomedular esteve preservada, sem perda da definição corticomedular e ecogenicidade normal nos grupos entre os tempos. Vimos também que nos ureteres e uretra não foram identificadas alterações, assim como a ausência de urólitos ou coágulos em vesícula urinária de todos os cães durante o acompanhamento até 360 dias.

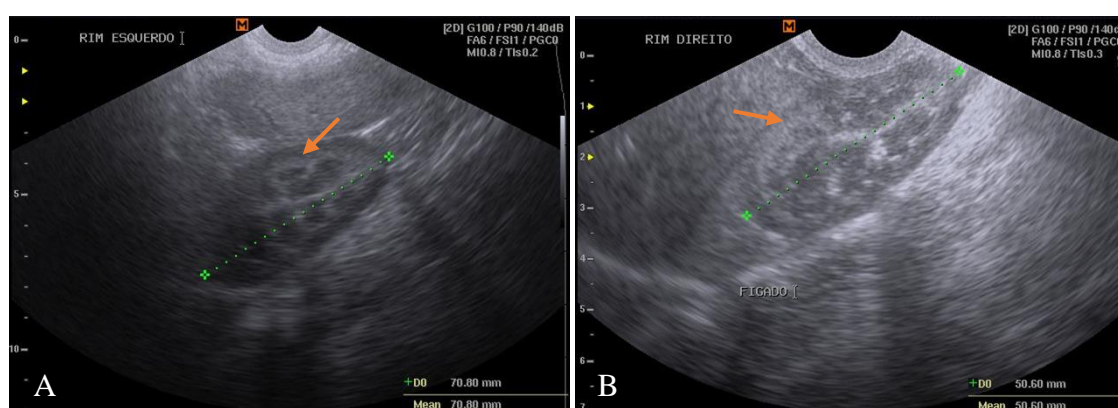
**Tabela 01. Alterações renais observadas em ultrassom abdominal em modo-B de cães com leishmaniose, em grupo experimentais com e sem terapêutica durante 360 dias.**

ULTRASSONOGRAFIA	N	SINAL RENAL MEDULAR (BILATERAL)				MINERALIZAÇÃO DISTRÓFICA RENAL (BILATERAL)			
		D0	D63	D120	D360	D0	D63	D120	D360
CONTROLE (G1)	6	0	6	6	6	0	0	0	1
ALOPURINOL (G2)	8	0	8	8	8	1	4	4	5
ALOP. + VACINA (G3)	8	0	0	0	3	1	1	1	2
<b>TOTAL</b>	<b>22</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>8</b>

Grupo 1: não recebeu terapêutica. Grupo 2: recebeu terapêutica com alopurinol. Grupo 3: recebeu imunoterapia, imunização com uso do alopurinol.

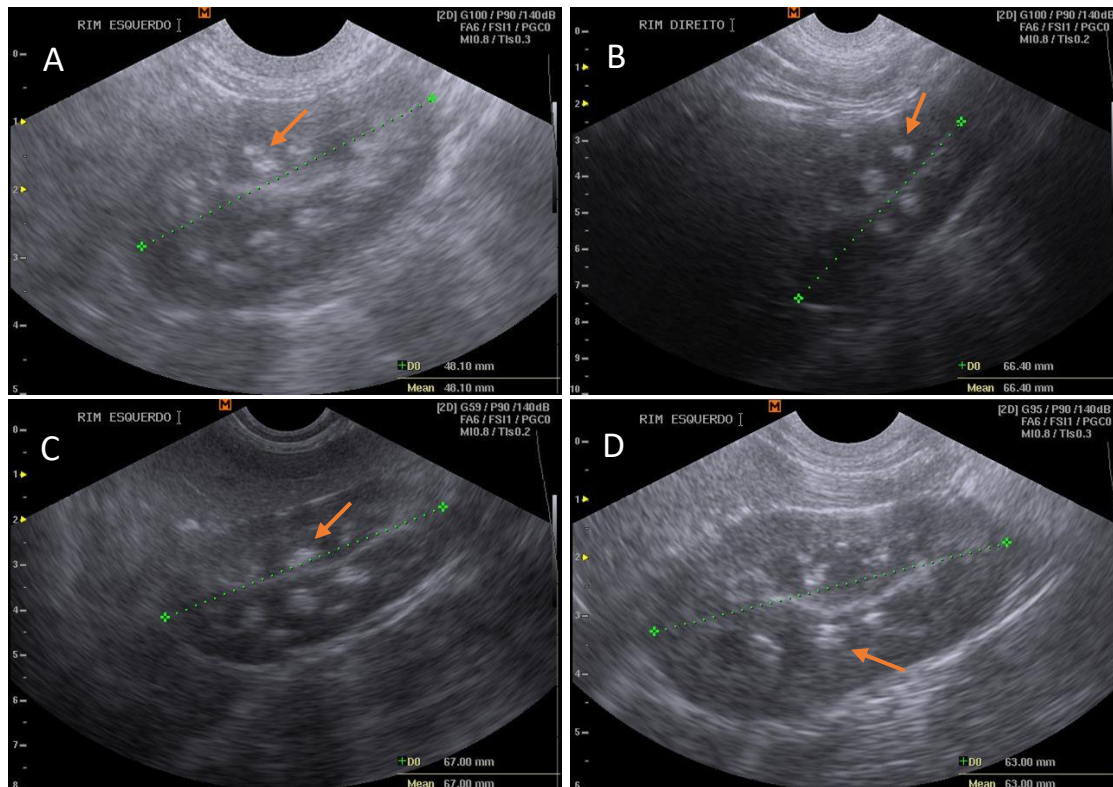
Dentre os achados ultrassonográficos renais que encontramos o sinal medular foi o que mais esteve presente (**Figura 02**), em que antes do tratamento todos os grupos, apresentaram ausência dele, e que a partir da avaliação ultrassonográfica em 63 dias de

acompanhamento, o sinal medular foi observado nos grupos controle (G1) e alopurinol (G2) (**Tabela 01**), e se mantiveram constante durante todo o acompanhamento até os 360 dias, ou seja, o sinal medular esteve presente em 100% (14/14) dos animais dos dois grupos. Já o grupo alopurinol + vacina (G3) o sinal medular só foi observado nos 360 dias de acompanhamento, com apenas 37,5% (3/8) desses animais. O que demonstra que todos os grupos antes do experimento apresentaram ausência do sinal medular, e que o seu surgimento foi mais demorado no grupo que recebeu a imunoterapia (G3), ao contrário dos demais grupos que tiveram 100% (14/14) dos animais com a presença desse achado após 63 dias e que permaneceram até o término do acompanhamento (D360) (**Tabela 01**).



**Figura 02.** Imagem renal de dois cães apresentando sinal medular renal, linha hiperecoica distinta na medula renal (setas), paralela à junção corticomedular, presente na imagem A, rim esquerdo (G1) e na imagem B, rim direito (G2), após 63 dias de acompanhamento.

Em nosso estudo a mineralização distrófica (**Figura 03**) foi observada principalmente nos cães que receberam alopurinol, na monoterapia ou na imunoterapia, durante todos os tempos de acompanhamento, que ao final do experimento (D360), o grupo alopurinol (G2) apresentou 62,5% (5/8), o grupo alopurinol + vacina (G3) com 25% (2/8) e grupo controle (G1) que até então não havia presença de nefrocalcinose, foi visualizado pela ultrassonografia, com 16,6% (1/6) dos cães (**Tabela 01**).



**Figura 03.** Imagem renal de cães apresentando mineralização distrófica renal (setas), em imagem A, B e C cães que receberam monoterapia com alopurinol após 63 e 120 dias respectivamente, em imagem D cão que recebeu imunoterapia após 360 dias de acompanhamento.

Os resultados para detecção de proteína na urina pela razão proteína/creatinina (RPC) estão dispostos na **Tabela 02** e **Figura 04**. Valores dados em mediana demonstraram que o grupo controle permaneceu em resultados indeterminados, ditos limítrofes, durante todo os tempos de monitoramento (D0, D120 e D360), o grupo alopurinol apresentou proteinúrico antes da indução terapêutica (D0) e no decorrer do acompanhamento os valores reduziram (D120 e D360), entretanto com valores limítrofes, já o grupo da imunoterapia antes da terapêutica (D0) apresentou-se limítrofe, e em 120 e 360 dias do experimento reduziu e se manteve não proteinúrico (**Tabela 02**).

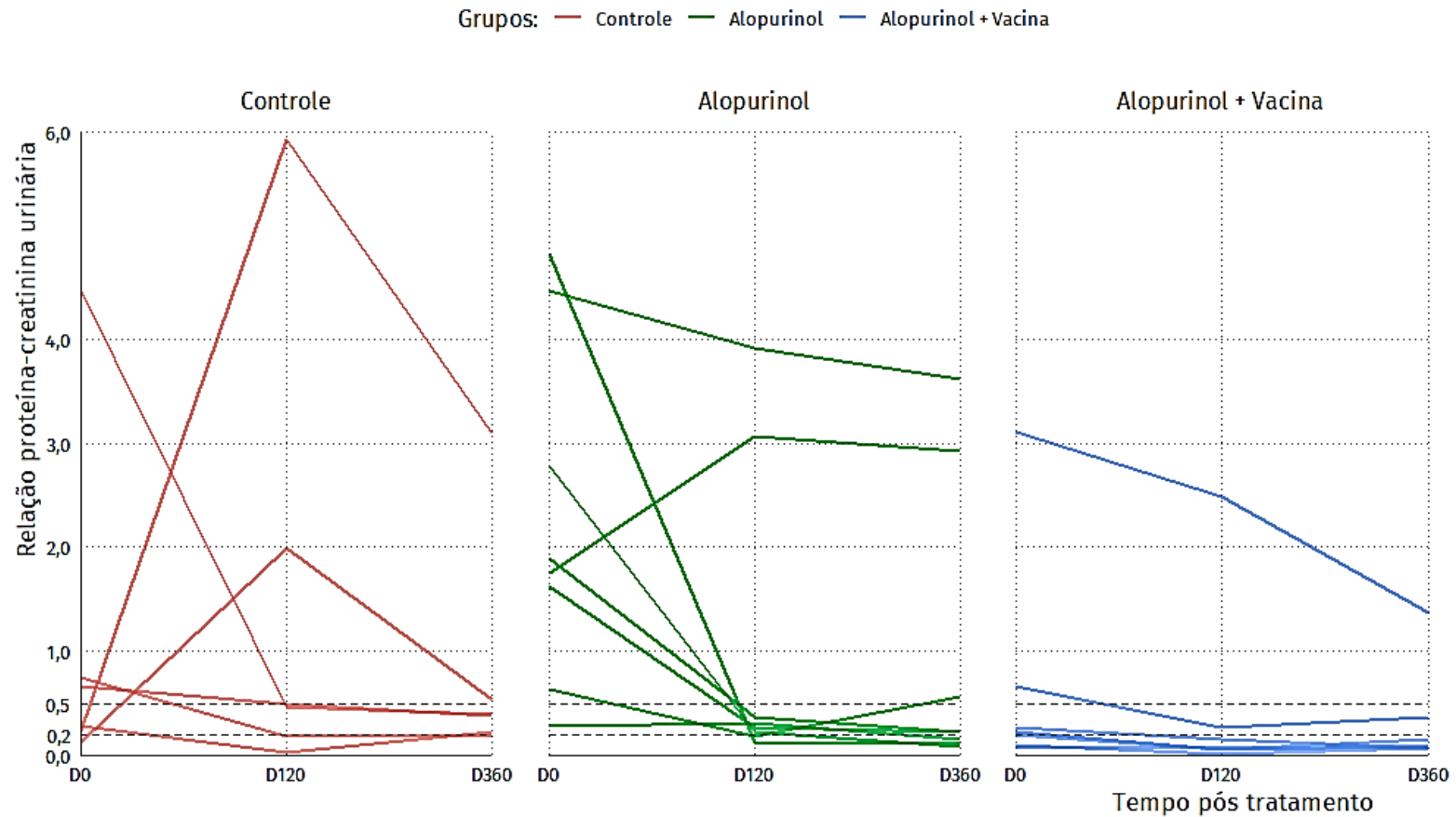
**Tabela 02 . Avaliação da razão proteína creatinina urinaria (RPC) de cães com leishmaniose visceral, em grupos experimentais com e sem terapêutica durante 360 dias.**

GRUPOS	RPC					
	D0		D120		D360	
	Mediana	Percentil 95%	Mediana	Percentil 95%	Mediana	Percentil 95%
CONTROLE (G1)	0,47	(3,53)	0,48	(4,94)	0,39	(0,51)
ALOPURINOL (G2)	1,83	(4,69)	0,29	(3,61)	0,23	(3,41)
ALOP. + VACINA (G3)	0,23	(2,49)	0,07	(1,71)	0,10	(1,01)

Dados dispostos em mediana com percentis nos grupos entre os tempos. Grupo 1: não recebeu terapêutica. Grupo 2: recebeu terapêutica com alopurinol. Grupo 3: recebeu imunoterapia, imunização com uso do alopurinol. Não proteinúrico < 0,2; Proteinúrico Limítrofe 0,2-0,5; Proteinúrico > 0,5.

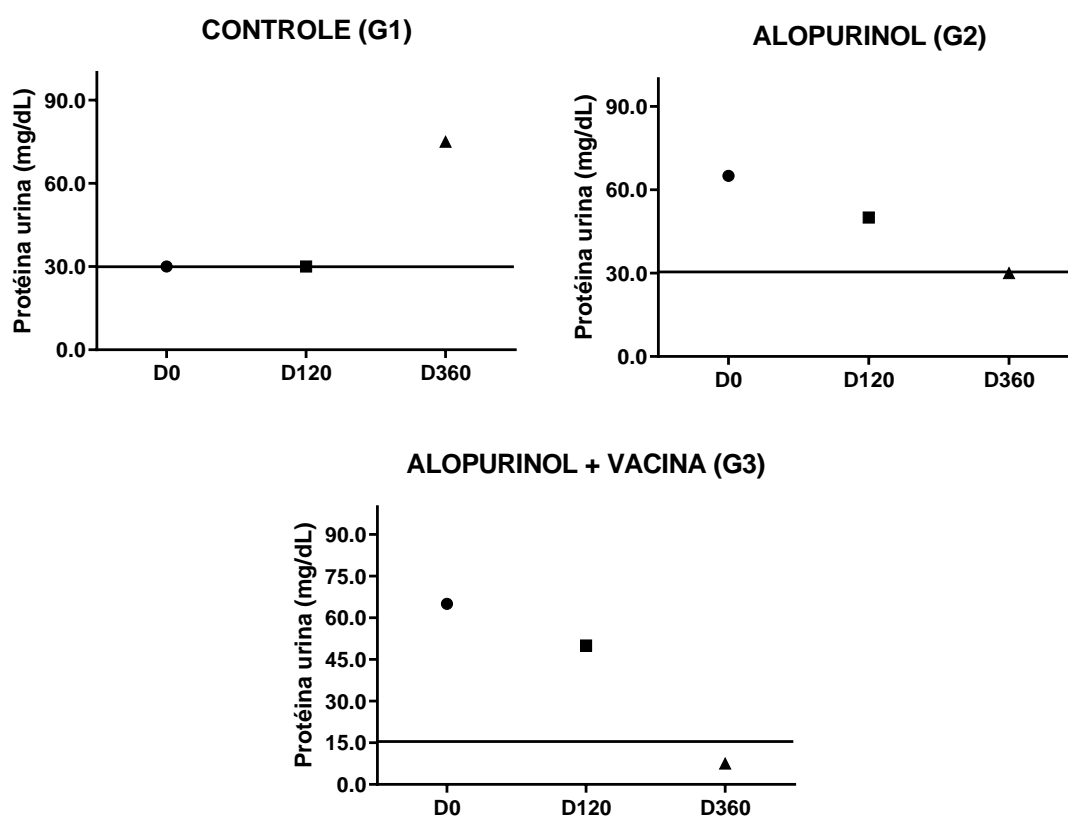
Na avaliação individual e em grupo da RPC urinária dos cães com leishmaniose submetidos ao experimento, não houve diferença entre os grupos, apesar do grupo que recebeu a imunoterapia (G3) ter se mantido não proteinúrico e o grupo do alopurinol ter tido uma redução relevante comparando ao tempo D0 e D360 (**Figura 04**).





**Figura 04. Razão proteína/creatinina na urina (RPC).** Avaliação individual da RPC urinária de cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. em cada grupo (G1, G2, G3) entre os tempos (D0, D120, D360). A análise foi realizada a partir dos dados de média, desvio padrão, mediana e através do modelo linear misto de medidas repetidas, com intercepto aleatório por indivíduo. **Não proteinúrico** < 0,2; **Proteinúrico Limítrofe** 0,2-0,5; **Proteinúrico** > 0,5. **Grupo controle (G1):** seis cães que não receberam medicação, **Grupo Alopurinol (G2):** oito cães que receberam o alopurinol em monoterapia por via oral na dose 20 mg/Kg, 1x ao dia, durante 90 dias, **Grupo Alopurinol e Vacina / Imunoquimioterapia (G3):** oito cães que foram imunizados por injeções subcutâneas com a formulação Leish-F2 + SLA-SE (20 µg cada), 6 doses, com intervalo de 3 semanas associados com alopurinol na dose descrita no G2.

Em análise da presença de proteína na urina pelos resultados de urinálise (EAS), podemos observar proteinúria presente no tempo zero em todos os grupos, com redução da proteinúria observada apenas nos grupos que receberam terapêutica, grupo 2 (alopurinol) e grupo 3 (imunoquimioterapia), onde observamos diferença significativa do grupo controle (G1) ao grupo que recebeu apenas alopurinol (G2) e ao que recebeu imunoquimioterapia (G3), mas não entre o G2 e G3 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 05**).



**Figura 05. Proteinúria pela urinálise (EAS).** Avaliação da presença de proteína na urina pela urinálise de cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. em cada grupo (G1, G2, G3) entre os tempos (D0, D120, D360). A análise foi realizada a partir dos dados de média, desvio padrão e mediana. **Ausência de proteínas:** menos que 10 mg/L; **Traços de proteínas:** entre 10-30 mg/L; **1+** = 30 mg/L; **2+** = 40-100 mg/L; **3+** = 150-350 mg/L; **4+** = maior que 500 mg/L (THRALL et al., 2015). **Grupo controle (G1):** seis cães que não receberam medicação, **Grupo Alopurinol (G2):** oito cães que receberam o alopurinol em monoterapia por via oral na dose 20 mg/Kg, 1x ao dia, durante 90 dias, **Grupo Alopurinol e Vacina/ Imunoquimioterapia (G3):** oito cães que foram imunizados por injeções subcutâneas com a formulação Leish-F2 + SLA-SE (20 µg cada), 6 doses, com intervalo de 3 semanas associados com alopurinol na dose descrita no G2.

A técnica de ELISA é um teste sorológico utilizado para diagnosticar a maioria das doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose. Embora a técnica seja sensível, sua especificidade depende do antígeno aplicado (FARAHMAND e NAHREVANIAN,

2016) e da amostra utilizada. Para superar as limitações atuais dos métodos diagnósticos, é desejável uma estratégia alternativa que deve ter várias características, incluindo ser não invasiva, precisa e viável. Atualmente vem se desenvolvendo pesquisas com o intuito de melhorar o desempenho da técnica de ELISA para o diagnóstico sorológico de LV, incluindo a análise de vários antígenos recombinantes. Várias amostras obtidas por métodos não invasivos podem ser utilizadas, como saliva, fluido oral, swab bucal ou urina, já relatados como amostras promissoras para o diagnóstico de LV (ABEIJON e CAMPOS NETO, 2013; VALLUR et al., 2015). Dentre estas, amostras de urina vem demonstrando excelente desempenho no diagnóstico por ELISA com uso de antígeno recombinante (ISLAM et al., 2012).

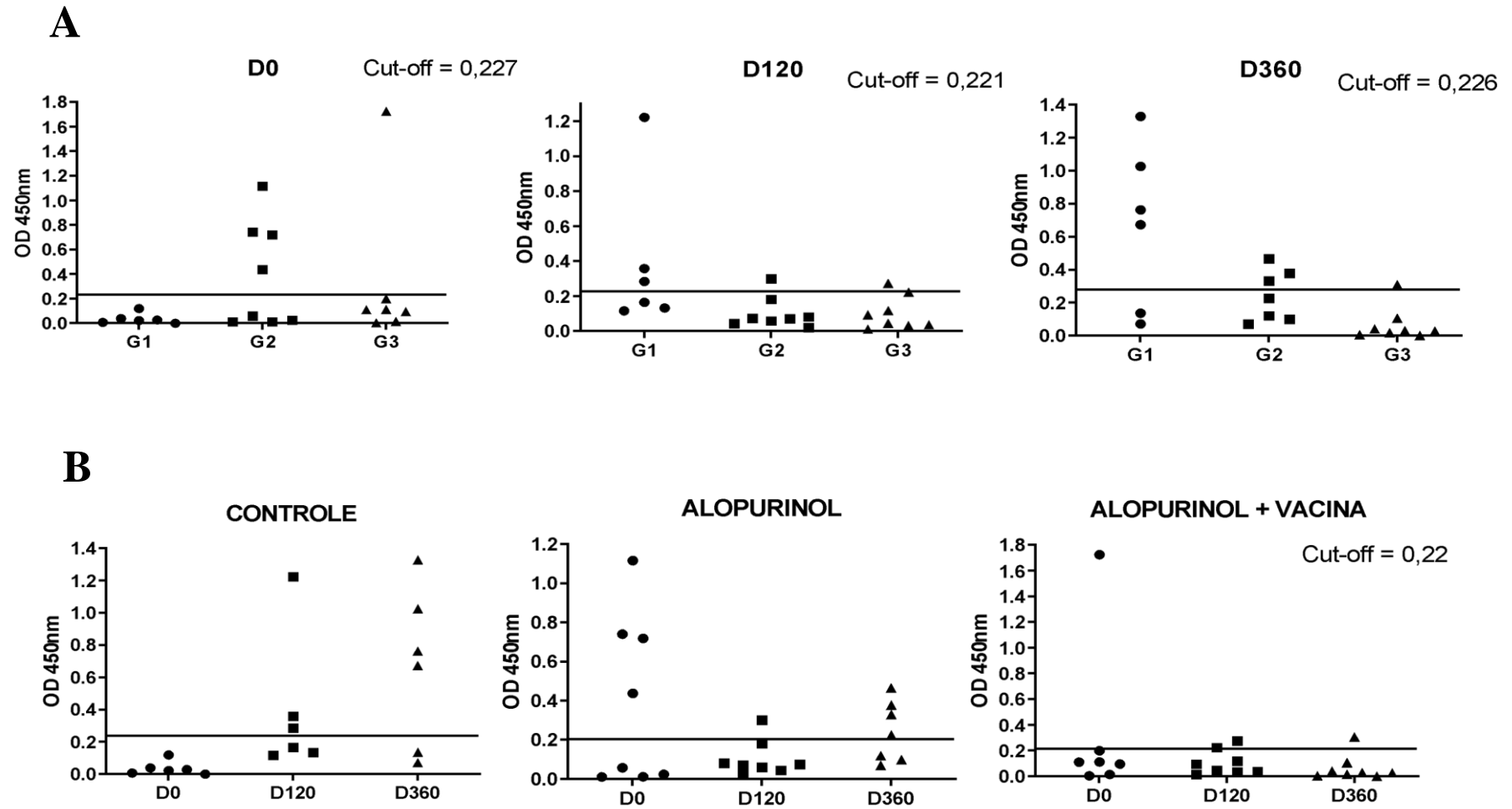
Em nosso trabalho realizamos o ELISA utilizando amostra de urina de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. para avaliar a sensibilidade do teste para detecção de anticorpos anti-leishmania presentes na urina. Para tanto utilizamos teste padrão de rotina para diagnóstico da Leishmaniose Canina, que utiliza antígeno solúvel de leishmania (SLA). Em uma visão geral observamos neste estudo que foi possível detectar anticorpos anti-leishmania nas amostras de urina de cães positivos para a enfermidade (**Figura 06**).

Os resultados demonstram que no tempo D0 (antes do tratamento) animais do G2 e G3 foram reativos no teste, e os animais que não receberam terapêutica (G1), aumentaram a reatividade apenas em 120 e 360 dias após início do experimento, ou seja, apresentaram aumento nos níveis de anticorpos detectados nas amostras de urina, ao contrário do G2 e G3 que reduziram após introdução terapêutica. (**Figura 06-A**).

Quando comparamos os resultados discriminando cada grupo observou-se que no grupo controle (G1) em D0 as amostras de urinas dos seis cães com LV não apresentaram reatividade no exame de ELISA, ou seja, não foram detectados anticorpos nessas amostras, entretanto com o passar dos dias de acompanhamento, 120 dias após, vimos que 50% (3/6) dos animais deste grupo apresentaram anticorpos na urina, e que, aos 360 dias, estes animais apresentaram um aumento na densidade ótica, indicando uma aumento na sua titulação. Neste tempo de avaliação, ainda, um animal até então apresentava-se não reativo nos tempos anteriores, positivou, com detecção de anticorpo na amostra de sua urina, totalizando 66,67% (4/6) dos animais deste grupo com presença de anticorpos na urina (**Figura 06-B**).

Ao avaliar o grupo alopurinol (G2) em D0 (antes do tratamento) vimos que quatro cães com LV estavam reagentes no teste de ELISA (4/8), o que demonstra que as amostras de urinas desses animais apresentavam anticorpos anti-leishmania e com títulos altos quando comparado ao ponto de corte do exame. Ao avaliarmos os demais dias após início do tratamento, vimos que apenas um animal se manteve reativo durante os tempos (D0, D120 e D360), e que em D120 apenas este animal foi reativo (1/8), ou seja, excretou anticorpos pela urina. Já em 360 dias de acompanhamento, 50% (4/8) dos animais deste grupo apresentaram anticorpos anti-leishmania na urina, o que sugere que a terapia com alopurinol induz uma redução nos títulos de anticorpos nas amostras de urina durante o efeito da medicação (**Figura 06-B**).

O grupo alopurinol + vacina (Leish-F2 + SLA-SE) (G3) apresentou um único cão (1/8) em que sua amostra de urina foi reativa em D0, e após imunoterapia negativou pelo exame de ELISA, ou seja, não foi detectado anticorpos anti-leishmania nessa amostra de urina em 120 e 360 dias de acompanhamento, com uma diferença significativa de D0 aos tempos a frente avaliados. Em D120 um animal até então não reativo, apresentou-se reativo com uma baixa titulação de anticorpos e que em D360 se manteve reativo em uma titulação semelhante (**Figura 06-B**).



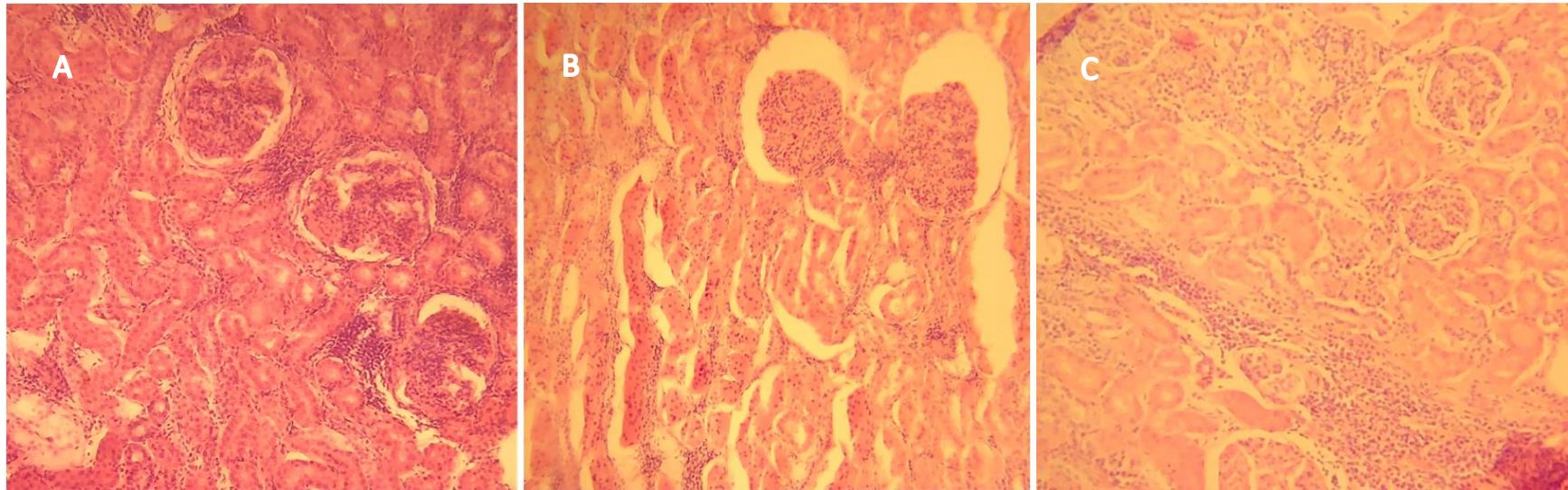
**Figura 06. Anticorpos IgG em urinas de cães.** Nível de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. realizado pelo teste de ELISA, nos tempos D0, D120 e D360. Urina de cães proveniente de áreas endêmicas para Leishmaniose Canina testados com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). O cut-off foi calculado a partir da média dos valores negativos com a soma de um fator e as ODs com valores acima da faixa cinza (entre 0,22 e 0,27) são ditas reagentes. Os pontos nos gráficos representam a média das OD de cada amostra. A análise foi realizada pelo software GraphPad Prism 8.0. **A:** Avaliação do tempo entre os grupos. **B:** Avaliação de cada grupo entre os tempos. **G1:** seis cães que não receberam medicação, **G2:** oito cães que receberam o alopurinol em monoterapia por via oral na dose 20 mg/Kg, 1x ao dia, durante 90 dias, **G3:** oito cães que foram imunizados por injeções subcutâneas com a formulação Leish-F2 + SLA-SE (20 µg cada), 6 doses, com intervalo de 3 semanas associados com alopurinol na dose de 20 mg/kg, 1x ao dia, durante 90 dias.

Os resultados de histopatológico renal obtidos a partir do fragmento de tecido renal dos cães coletados após 360 dias de acompanhamento, encontram-se descritos em porcentagem na **tabela 03** e **figura 07**, no qual as glomerulonefrites (GN) observadas neste estudo, foram GN membranoproliferativa, glomeruloesclerose, GN proliferativa, além de amiloidose e presença de nefrite tubulointestinal em cães naturalmente infectados com *Leishmania sp.*

**Tabela 03 . Histopatológico renal de cães com leishmaniose, em grupos experimentais com e sem terapêutica após 360 dias de acompanhamento.**

DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO	GRUPOS N (%)		
	CONTROLE (G1)	ALOPURINOL (G2)	ALOP. + VACINA (G3)
<b>GN</b>			
<b>Membranoproliferativa</b>	3/6 (50%)	3/6 (50%)	2/6 (33%)
<b>Glomeruloesclerose</b>	5/6 (83%)	1/6 (16%)	2/6 (33%)
<b>GN Mesangioproliferativa</b>	1/6 (16%)	3/6 (50%)	4/6 (66%)
<b>Amiloidose</b>	0	2/6 (33%)	0
<b>Nefrite Tubulointestinal</b>	6/6 (100%)	4/6 (66%)	2/6 (33%)

Grupo 1: não recebeu terapêutica. Grupo 2: recebeu terapêutica com alopurinol. Grupo 3: recebeu imunoterapia, imunização com uso do alopurinol.



**Figura 07. Histopatológico renal** - Avaliação das principais glomerulonefrites e glomerulopatias de cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. nos grupos estudados (G1, G2, G3) após 360 dias de monitoramento. As imagens foram obtidas por microscopia de luz, na objetiva de 40x. **Grupo controle (G1):** cão que não recebeu medicação, **Grupo Alopurinol (G2):** cão que recebeu o alopurinol em monoterapia por via oral na dose 20 mg/Kg, 1x ao dia, durante 90 dias, **Grupo Alopurinol e Vacina/ Imunoquimioterapia (G3):** cão que foi imunizado por injeções subcutâneas com a formulação Leish-F2 + SLA-SE (20 µg cada), 6 doses, com intervalo de 3 semanas associados com alopurinol na dose descrita no G2. **A:** cão G1 observar nefrite intersticial e glomerulosclerose. HE. 50µm. **B:** cão G2 Observar glomerulonefrite membranoproliferativa e discreta nefrite intersticial. HE 500µm. **C:** cão G3 Notar glomerulonefrite mesangioproliferativa e moderada nefrite intersticial. HE. 50µm.

#### 4. Discussão

Um estudo que avaliou a associação do sinal da medular à nefropatia, propôs uma divisão entre dois tipos de sinal medular. O que se apresentava como uma linha hiperecogênica fina, de margens bem definidas (linha) e outro grupo onde havia uma área ou banda hiperecogênica mais espessa, com pobre definição das margens (banda) (CORDELLA et al., 2020), e que este último está mais comumente associado à doença renal (FERREIRA et al., 2020). O sinal medular foi um dos achados ultrassonográficos mais relevantes observados neste estudo, entretanto a linha hiperecoica observada nos cães com leishmaniose era considerada fina e com margens definidas.

O sinal medular já foi descrito em cães e gatos com nefrose por oxalato atribuída à intoxicação por etilenoglicol (ADAMS et al., 1991), em cães com doença renal aguda e crônica, como nefropatia hipercalcêmica, nefrite intersticial crônica, nefrose tubular aguda (ADAMS et al., 1989; BARR et al., 1989; BILLER et al., 1992), e descritos em gatos com doença renal que apresentavam vasculite piogranulomatosa associada à peritonite infecciosa felina e nefrite intersticial crônica (BILLER et al., 1992), porém pode ser um achado comum tanto em gatos (PAEPE et al., 2013; FERREIRA et al., 2020) como em cães saudáveis (MANTIS et al., 2000; HART et al., 2013).

Entretanto esse achado ainda é inespecífico, em que uma parte da literatura indica ser sugestivo de lesão renal, e outra que é um achado observado também em animais sem disfunção renal, portanto, sua presença não deve ser conclusiva, havendo há necessidade de dados clínicos e de exames complementares para melhor interpretação (ADAMS et al., 1989; BARR et al., 1989; BILLER et al., 1992; MANTIS et al., 2000; VAC, 2004; HART et al., 2013).

Os cães com leishmaniose tendem a desenvolver doença renal crônica, (PENNINCK e D'ANJOU, 2011; BRASILEISH, 2018; LEISHVET, 2018; IRIS, 2019), nosso estudo demonstrou que o sinal medular em cães com leishmaniose pode estar relacionado com precocidade no surgimento de lesão renal, e que cães que recebem imunoterapia podem retardar o aparecimento desse achado, uma vez que cães sem tratamento e cães com terapêutica medicamentosa não impediram o seu surgimento. Outros estudos também demonstraram a importância da ultrassonografia como auxílio no diagnóstico de animais com leishmaniose, tanto na avaliação de alteração renal, como



para embasamento do clínico no acompanhamento das consequências gerais que a infecção pode causar nesses pacientes (BALTAZAR et al., 2016; OLIVEIRA, 2018).

Os exames de imagem podem demonstrar alterações no tamanho, forma, localização e presença de mineralização renal (POLZIN, 2009), outro achado importante observado em nosso estudo foi a mineralização distrófica.

Mineralização patológica é a deposição anormal de minerais em tecidos. Nos tecidos que apresentam lesões, além do cálcio, outros minerais (ferro, magnésio e fósforo) podem ser encontrados em concentrações inferiores. Portanto o termo mineralização tem sido mais apropriado do que calcificação, apesar do cálcio ser o mineral mais presente (MYERS & MCGAVIN, 2009; WERNER, 2011). A mineralização do tipo distrófica ocorre quando há deposição de minerais em tecidos lesionados, de natureza necrótica, degenerativa ou inflamatória e independe da concentração sérica de cálcio (PEIXOTO et al., 2012; DOERR et al., 2013).

A mineralização que ocorre no rim, processo denominado nefrocalcinose, não é visível macroscopicamente, porém os rins podem ranger ao corte, devido à calcificação das membranas basais dos túbulos, da cápsula de Bowman e do epitélio tubular (SILVEIRA et al., 2015). Contudo, Serakides (2011) relata que cães com DRC as mineralizações de tecidos moles são distróficas, por serem precedidas de alterações degenerativas induzidas por toxinas acumuladas na corrente sanguínea, tais como creatinina, amônia e PTH, bem como pela ausência de hipercalcemia.

A presença da mineralização distrófica observada em nosso experimento foi principalmente nos cães que receberam alopurinol durante todos os tempos de acompanhamento, demonstrando que cães com leishmaniose visceral que usam alopurinol tendem a acelerar o surgimento dessa mineralização, que consiste na presença de pontos hiperecogênicos dispersos no parênquima renal visto em ultrassonografia (NYLAND & MATTOON, 2005). O diagnóstico definitivo para a identificação de mineralização para as diferentes desordens renais é difícil, entretanto Baltazar et al. (2016) também observaram a presença de focos puntiformes hiperecogênicos no parênquima renal, caracterizando mineralização distrófica renal em cães positivos para leishmaniose, corroborando com nossos resultados.

Torres et al. (2016) concordaram também com os nossos resultados, ao avaliar efeitos adversos do alopurinol no sistema urinário durante o tratamento de leishmaniose em cães, observando a presença de mineralização renal, além do surgimento também de

xantinúria e urolitíase. Jesus et al. (2022) relatam que a xantínuria é um efeito secundário bastante comum do tratamento prolongado com alopurinol em cães com leishmaniose e recomenda monitoramento periódico e medidas preventivas, com acompanhamento por exame de urina e pelo exame de imagem.

O comprometimento renal na leishmaniose canina continua sendo indicativo de prognóstico ruim, a ultrassonografia abdominal e a RPC com amostra de urina permanece sendo uma análise importante na avaliação precoce de lesão renal, apesar da presença de novos biomarcadores renais e da creatinina ser dita como biomarcador tardio (POLI et al., 1991; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; ARESU et al., 2013; GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 2015; IBBA et al., 2016; BAUMGARTNER et al., 2022).

Os cães com leishmaniose acompanhados em nosso estudo, não apresentaram diferença significativa entre os grupos (G1, G2 e G3) na análise da razão proteína/creatinina urinária (RPC), apesar do grupo que recebeu monoterapia com alopurinol ter demonstrado redução relevante, e o grupo da imunoquimioterapia não ter se apresentado proteinúrico durante e ao final dos dias do experimento. Já na análise de proteinúria pela EAS, vimos redução significativa da presença de proteína na urina com o passar dos tempos no grupo que recebeu alopurinol (G1) e no grupo que recebeu a imunoquimioterapia, respectivamente, comparado ao grupo que não recebeu terapêutica (G1). Provérbio et al. (2014) destacam a associação significativa entre títulos de anticorpos séricos e proteinúria, pelo teste de imunofluorescência (IFAT) e razão RPC, em que proteinúria alta está presente em cães com títulos sorológico alto e maior sintomatologia. Nascimento et al. (2020), relataram que essa imunoquimioterapia proporcionou melhora clínica e redução da carga parasitária por longo prazo, demonstrando possibilidade de uma terapêutica responsiva, concordando com nosso resultado devido à ausência de proteinúria pela RPC, demonstrando que a formulação terapêutica é segura não só para a melhora clínica e parasitológica, mas consequentemente para evitar o surgimento de lesão glomerular renal.

A importância de uma terapêutica na leishmaniose que controle a parasitemia e sinais clínicos, é tão necessária, quanto o controle da função renal, evitando toxicidade medicamentosa e surgimento de proteinúria que comprometa seu prognóstico. A imunoquimioterapia realizada nesse estudo não apresentou nenhum risco indicativo de progressão em lesão renal, ao contrário os resultados se mantiveram não proteinúrico pela RPC urinária. Entretanto os resultados vistos na EAS demonstram mais relevância ao

comparamos os grupos entre os tempos, uma vez que a RPC não demonstrou uma maior proteinúria no grupo controle, e a EAS pontua que cães sem terapêutica tendem a aumentar a presença de proteínas na urina, ao contrário dos grupos que receberam terapêutica, principalmente o de melhor resultado, o grupo que recebeu a imunoquimioterapia com ausência de proteínas na urina em 360 dias de monitoramento.

Acreditamos que as urinas conservadas com 0,3 mol/l de azida de sódica ( $\text{NaN}_3$ ) substância utilizada com amostras de urina para conservação em média de 8, 16 e 24 h, podem ter tido uma influência na qualidade da detecção de proteinúria e interferido os resultados na RPC, uma vez que os resultados obtidos nas EAS realizadas dentro de 4 h após coleta por cistocentese foram mais precisos que os vistos na RPC, realizada após dois anos de conservação dessas urinas com  $\text{NaN}_3$  em freezer – 80 °C.

Outras terapêuticas foram testadas quando ao risco de lesão renal, dentre esses estudos podemos relatar o uso da miltefosina com alopurinol, que demonstrou associação terapêutica segura e eficaz, não afetando a função renal e mostraram que cães proteinúricos ao receberem essa associação medicamentosa podem se tornar não proteinúricos (MIRO et al., 2009; MANNA et al., 2015; IBBA et al., 2016; PROVERBIO et al., 2016). Bianciardi et al. (2009) relatam que a terapêutica com uso de antimoniato de meglumina na abordagem do tratamento de cães com leishmaniose deve ser considerado com cautela, devido a toxicidade, vistos em danos tubulares renais, ao contrário do grupo tratado com miltefosina que não apresentou indicativos de lesão renal.

Solano-galleno et al. (2003) descreveram pela primeira vez a presença de IgG na urina de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, correlacionaram sua presença com as concentrações séricas de IgG e com a intensidade das lesões renais. Apesar da origem da imunoglobulina ter sido principalmente sistêmica em decorrência das lesões renais, os autores sugeriram que, ainda que em menor extensão, possa ocorrer produção local de imunoglobulinas. Em estudo semelhante envolvendo a detecção de IgA na urina de cães com leishmaniose, TODOLÍ et al. (2009) sugeriram que a produção local de imunoglobulina possa refletir a ocorrência de uma resposta imunológica *in situ* devido a presença do parasita no tecido renal.

A técnica de ELISA em nosso estudo foi mais sensível que a RPC na detecção de proteínas na urina e teve resultados semelhantes vistos nas EAS, podendo ser um biomarcador precoce na detecção de possível início de lesão renal, uma vez que imunoglobulinas são proteínas de maior peso molecular comparado a albumina,

predominante na urina de cães e gatos saudáveis e com doença renal. A albumina e proteínas maiores não estão presentes em grandes quantidades no filtrado glomerular devido a uma permeabilidade seletiva glomerular (GRAUER, 2022). A proteinúria em cães e gatos com DRC pode ocorrer devido a lesões glomerulares e/ou tubulares. A proteinúria tubular é tipicamente de menor magnitude em comparação com a proteinúria glomerular (GRAUER, 2019). A proteinúria glomerular é definida pela presença de albumina, que tem peso molecular de 69.000 daltons, e de proteínas de tamanhos maiores, como a imunoglobulina G, com peso molecular de 150.000 daltons, que compõem 80% das imunoglobulinas do organismo (MCPHERSON, 1999; ALVES, 2011; GRAUER, 2022). A presença da IgG pode ser sugestiva de toxicidade da proteinúria, e uma vez identificadas na urina o prognóstico renal a longo prazo é ruim (ALVES, 2011).

Em nosso estudo concordamos com Solano-gallego et al. (2003) que é possível detectar IgG em amostras de urina de cães com LV, vistos em todos os grupos (G1, G1, G3) e que o método de ELISA é confiável para o prognóstico de cães com leishmaniose em relação a RPC para cães com glomerulonefropatias, e concordamos também que pelo método de ELISA e EAS podemos sugerir que anticorpos urinários estejam presentes em cães proteinúricos.

A terapêutica com alopurinol pode reduzir a presença de anticorpos na urina, mas na ausência da medicação os animais voltam a excretar anticorpos urinário. Isso parece sugerir que o alopurinol pode perder seu efeito de proteção com a interrupção do tratamento e que o grupo controle (G1) que não recebeu terapêutica apresentou aumento significativo de anticorpos na urina dos cães durante o acompanhamento (D120, D360), e já os cães que receberam a imunoterapia apresentaram diminuição da excreção de proteínas pela urina, sugerindo uma influência sobre o sistema urinário, de que esse esquema terapêutico pode impedir a progressão de lesão renal.

O ELISA com urina é um método altamente sensível e específico para detecção quantitativa de anticorpos em doenças parasitárias. Além disso, a urina é mais aceitável para sua coleta, principalmente de indivíduos sem sinais clínicos (NAGAOKA et al., 2021). Os estudos com amostra de urina em ELISA estão mais voltados ao diagnóstico de LV em humanos, mas o nosso estudo vem demonstrar que a urina também pode ser uma amostra promissora para detecção de anticorpos anti-leishmania em cães com LV.

A urina contém muito menos proteínas do hospedeiro do que o plasma ou soro, portanto, pequenas quantidades de moléculas de organismos estranhos presentes nesta

excreção são muito mais prováveis de serem identificadas por espectrometria de massa do que no sangue. A presença de anticorpos excretados na urina pode ser detectável mais cedo do que a detecção do próprio patógeno em órgãos-alvo da doença (CAMPOS NETO e ABEIJON, 2020).

O diagnóstico em humano da LV com urina vem demonstrando ser uma escolha viável para a técnica de ELISA utilizando antígeno recombinante (ISLAM et al., 2012; ABEIJON e CAMPOS NETO, 2013; SINGH et al., 2013; VALLUR et al., 2015), entretanto em nosso estudo vimos que utilizando o teste padrão de rotina para o diagnóstico de leishmaniose canina, com antígeno bruto, também é possível detectar anticorpos excretados na urina, e que essa sensibilidade é demonstrada também pelo aumento de títulos de anticorpos ao passar dos dias de acompanhamento, demonstrando ser uma ferramenta útil para detecção de casos ativos e para o monitoramento do efeito da terapia e do comprometimento renal. Além disso, o anticorpo urinário permanece estável por um período prolongado a temperatura adequada (URNOVITZ et al., 1996; ISLAM et al., 2012).

Alguns achados apontaram como a provável causa da patologia renal é a deposição de complexos antígeno/anticorpo nas estruturas renais e ao intenso infiltrado inflamatório plasmocitário (MACHADO et al., 2012). A glomerulonefrite secundária a leishmaniose visceral indica que os cães podem apresentar proteinúria discreta à moderada sem quaisquer manifestações clínicas desses pacientes (GRAUER, 2005; LESS et al., 2005; VADEN, 2011).

Em nosso estudo identificamos as três principais categorias de doenças glomerulares pelo histopatológico nos cães após 360 dias de acompanhamento, as glomerulonefrites do tipo imunomediada, amiloidose e glomerulonefrite não imunomediada conforme a classificação de Cianciolo et al. (2013, 2016). Além da observação da presença de nefrite tubulointestinal em todos os grupos, com maior porcentagem (6/6 - 100%) no grupo controle que não recebeu terapêutica e com menor porcentagem o grupo que recebeu imunoquimioterapia (2/6 – 33%) (**Tabela 03**).

Contudo nossos resultados sugerem que cães com leishmaniose sem terapêutica tendem a apresentar no histopatológico renal maior presença de nefrite tubulointestinal (6/6-100%), glomeruloesclerose (5/6-83%), GN membranoproliferativa (3/6 – 50%) e GN mesangioproliferativa (1/6 – 16%), já os cães que recebem terapêutica tendem a ter maior predominância a GN mesangioproliferativa resultado semelhante tanto ao grupo

alopurinol (G1), quanto ao da imunoquimioterapia (G2) respectivamente (66 e 50%), e em menor presença a glomeruloesclerose (16 e 33%), GN membranoproliferativa (50 e 33%), nefrite tubulointestinal (66 e 33%) (**Tabela 03**). A deposição de imunocomplexos ao longo da membrana basal glomerular e tubular eventualmente resultava em glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial, o que pode levar à uma insuficiência renal; sendo essa, muitas vezes, a principal causa de morte em cães com Leishmaniose (SILVA, 2007, BANETH et al., 2008).

Cianciolo et al. (2016) relataram que a categoria de glomerulonefrite mediada por imunocomplexos (ICGN) incluiu casos com lesões histológicas de padrões membranoproliferativos, membranosos ou mesangioproliferativa. As demais incluíram cães controle e cães com não ICGN (amiloidose glomerular ou glomeruloesclerose segmentar focal).

Em nosso estudo as ICGN identificadas foram GN membranoproliferativa, com diagnóstico a partir da visualização de hiper celularidade nos glomérulos junto com o espessamento da cápsula de Bowman foi uma das lesões mais vista no grupo controle (G1) com 50 % (3/6) e no grupo alopurinol (G2) com 50% (3/6), já o grupo da imunoquimioterapia apresentou menor número de cães com esse tipo de lesão glomerular 33% (2/6). A GN mesangioproliferativa como glomerulonefrite mediada por imunocomplexos também foi observada, grupo controle (G1) com 16 % (1/6), grupo alopurinol (G2) com 50% (3/6) e grupo imunoquimioterapia com 66% (4/6) (**Tabela 03**). Nossos resultados concordam com estudos que relatam que cães com leishmaniose naturalmente infectados podem desenvolver nefropatias por deposição de imunocomplexos, com padrões histológicos mais comumente encontrados do tipo glomerulonefrite membranoproliferativa e mesangioproliferativa (COSTA et al., 2003; SILVA, 2007, BANETH et al., 2008; ARESU et al., 2007; ARESU et al., 2013; BALTAZAR et al., 2016).

A outra doença glomerular identificada em nosso estudo foi a glomeruloesclerose, classificada como glomerulonefrite não mediada por imunocomplexos (não ICGN), é vista como o estágio final da glomerulonefrite e caracteriza um quadro de doença renal crônica, com lesões glomerulares mais graves (ARESU et al., 2013; CIANCIOLO et al., 2013, 2016). A lesão do podócito pode ser um fator incitante no desenvolvimento da glomeruloesclerose, com genes podócitos mutados, tóxicos, infecções e estresse do citoesqueleto da hipertrofia celular demonstraram prejudicar essa linhagem celular. A

glomeruloesclerose secundária pode também ser causada por outros tipos de lesão no podócito, como o caso da glomerulonefrite por imunocomplexos que pode induzir lesão podocitária e glomeruloesclerose segmentar secundária em humanos e cães, o que dificulta o diagnóstico (NOEL, 1999; SCHELL e HUBER, 2012; CIANCIOLO et al., 2013, 2016).

Portanto a glomeruloesclerose apresenta lesões glomerulares mais graves, podendo ter depósitos de imunocomplexos quando estiver associada a uma doença base, secundária, como a leishmaniose. No estudo realizado foi visto que o grupo controle (G1), no qual não recebeu nenhum tratamento, apresentou predominância de diminuição de tamanho dos glomérulos com hialinização, correspondendo assim ao diagnóstico de glomeruloesclerose (5/6 – 83%) (**Tabela 03**).

E quanto aos processos presentes em região túbulo intersticial, notou-se que 12 dos 18 animais apresentaram processo inflamatório do tipo linfoplasmocitário, sendo o grupo controle (G1) compondo 100% dos animais com essa lesão. Outras lesões encontradas em menor número foram necrose epitelial, cilindros hialinos, hialinose arteriolar e depósito de hemossiderina. Em geral os animais dos 3 grupos (não tratados e tratados) apresentaram algum tipo de lesão renal, alguns apresentaram mais de um tipo de alteração, tanto glomerular, quanto tubulointersticial (**Tabela 03**). Os rins são órgãos alvos na leishmaniose canina quando se trata da deposição de imunocomplexos (SOLANO-GALEGO et al., 2011). A persistência das lesões nos grupos tratados pode sugerir uma cronicidade da infecção no órgão, embora ao final do experimento a carga parasitária tenha se apresentado reduzida (NASCIMENTO, 2020). O tempo da infecção até o início do tratamento, e a gravidade do quadro clínico desses animais são fatores que também podem influenciar na permanência dos danos e na funcionalidade dos órgãos.

## 5. Conclusões

O sinal medular renal visto em ultrassonografia, dito inespecífico para disfunção renal, foi sugestivo em nosso trabalho que esse achado pode estar relacionado com precocidade no surgimento de lesão renal em cães com leishmaniose, uma vez que esse achado foi observado após o acompanhamento nos cães do grupo sem terapêutica e com monoterapia com alopurinol, e que a imunoquimioterapia pode retardar o surgimento desse achado, demonstrando que cães que tendem a desenvolver doença renal crônica

podem ter uma nefroproteção ao receberem imunoterapia com alopurinol associado a imunização com Leish-F2 + SLA-SE. Observamos também que a mineralização distrófica renal pode estar presente em cães com leishmaniose, e que ela pode surgir de forma mais evidente com o uso prolongado do alopurinol.

A detecção de proteína na urina como biomarcador de lesão renal, foi mais sensível pelo método de ELISA e teve resultados semelhantes vistos nas EAS, ao contrário da razão proteína/creatinina urinária (RPC), apesar do grupo que recebeu a imunoterapia não ter se apresentado proteinúrico durante e ao final dos dias do experimento. O nosso estudo mostrou que o ELISA padrão com SLA realizado com amostra de urina pode ser considerado como biomarcador precoce de lesão renal, uma vez que imunoglobulinas são proteínas de maior peso molecular comparado as comumente encontradas na urina de cães com doença renal.

Nossos resultados demonstraram também que animais positivos sem tratamento tendem a aumentar os títulos de anticorpos na urina com o passar dos dias de acompanhamento, e que a terapêutica com alopurinol pode manter uma proteção na redução de anticorpos e que a suspensão dele leva os animais a excretar novamente anticorpos na urina. Já os cães que recebem a imunoterapia conseguiram reduzir os títulos de anticorpos na urina, manter baixos ou negativar pelo teste ELISA, sugerindo que esse esquema terapêutico pode impedir a progressão de lesão renal. Portanto o diagnóstico de ELISA para detecção de anticorpos na urina pode ser uma nova ferramenta para investigação e monitoramento da função renal na LV em cães e espera-se que seja realizado novos estudos para futura aplicação dessa técnica.

No histopatológico renal dos cães com leishmaniose tratados ou não tratados apresentam alterações, tanto glomerular, quanto tubulointersticial, tais como GN membranoproliferativa, GN mesangioproliferativa, glomeruloesclerose e nefrite tubulointersticial. E cães que não receberam terapêutica tiveram maior predominância para nefrite tubulointersticial e glomeruloesclerose o que pode levar à uma insuficiência renal; sendo essa, muitas vezes, a principal causa de morte em cães com leishmaniose.

Concluindo assim que o sinal medular e a mineralização na ultrassonografia pode estar presente em cães com leishmaniose, que o método de ELISA pode ser considerado um biomarcador renal, apresentando ser mais sensível que a RPC na detecção de proteínas na urina e que cães que não recebem terapêutica tendem a apresentar lesões glomerulares e tubulointersticial mais evidente pelo histopatológico, cães com



leishmaniose que tendem a desenvolver DRC podem ter uma nefroproteção ao receberem imunoterapia com alopurinol associado a imunização com Leish-F2 + SLA-SE, uma vez que os dados desse estudo sugerem alguma influência positiva da vacina.

## 6. Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado concedida à MOURA, L. D. Aos autores e pesquisadores que desenvolveram o estudo, já com primeira publicação, por terem concedido amostras armazenadas desse experimento grandioso. Ao apoio da Universidade Federal do Piauí (UFPI) com suporte laboratorial Laboratório de Doenças Infecciosas (LASAN), do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco (NUPCELT), do Hospital Veterinário Universitário (HVU) e ao suporte ofertado da Unidade de Diagnóstico Veterinário de Teresina (UDVET). Meu muito obrigado a todos que contribuíram pelo desenvolvimento deste trabalho.

## 7. Referências

Abeijon C, Campos-Neto A. Potential non-invasive urine-based antigen (protein) detection assay to diagnose active visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**. 2013 May 30;7(5):e2161. doi: 10.1371/journal.pntd.0002161.

Adams W. H. et al. Early renal ultrasonographic findings in dogs with experimentally induced ethylene glycol nephrosis. **Am J Vet Res**. 1989 Aug;50(8):1370-6. PMID: 2675698.

Adams WH, Toal RL, Breider MA. Ultrasonographic findings in dogs and cats with oxalate nephrosis attributed to ethylene glycol intoxication: 15 cases (1984-1988). **J Am Vet Med Assoc**. 1991 Aug 15;199(4):492-6. PMID: 1917665.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**. 2006 Dec;22(12):552-7. doi: 10.1016/j.pt.2006.09.004.

Alves, M. A .V. F. R. **Biomarcadores em Glomerulopatias**. In: ABENSUR,H. Biomarcadores da nefrologia. cap. 3. p. 37-40. 2011.

Aresu L, Valenza F, Ferroglio E, Pregel P, Uslenghi F, Tarducci A, Zanatta R. Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog. **J Vet Diagn Invest**. 2007 Sep;19(5):569-72. doi: 10.1177/104063870701900520.

Aresu L, Benali S, Ferro S, et al. Light and Electron Microscopic Analysis of Consecutive Renal Biopsy Specimens From Leishmania-Seropositive Dogs. **Veterinary Pathology**. 2013;50(5):753-760. doi:10.1177/0300985812459336.

Baltazar P. I. et al. Comparative B-mode and Doppler renal ultrasonography with histopathological findings in dogs positive for canine visceral leishmaniasis. **Microsc Res Tech**. 2016 Jul;79(7):637-45. doi: 10.1002/jemt.22677.

Baneth, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**. 2008 Jul;24(7):324-30. doi: 10.1016/j.pt.2008.04.001.

Barbieri, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol**, 2006. v. 28, n. 7, p. 329-37, doi: 10.1111 / j.1365-3024.2006.00840.x.

Barr F. J. et al. Hypercalcemic nephropathy in three dogs: sonographic appearance. **Veterinário Radiol** . 1989 ; 30 : 169-173. doi: 10.1111/j.1740-8261.1989.tb00770.x.

Barr, F.J.; Holt, P.E.; Gibbs, C. Ultrasonographic measurement of normal renal parameters. **Journal of Small Animal Practice**, 1990. v.31, n.4, p.180-184. doi: 10.1111/j.1748-5827.1990.tb00764.x

Baumgartner F, Boretti FS, Gerber B. Prognostic factors in dogs with common causes of proteinuria. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2022 Jul;164(7):525-533. **English**. doi: 10.17236/sat00362.

Benderitter T. et al. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**. 1988 Aug;82(4):335-41. doi: 10.1080/00034983.1988.11812255.

Bianciardi P, et al. Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys. **Toxicol Pathol**. 2009 Oct;37(6):770-5. doi: 10.1177/0192623309344088.

Biller D. S. Renal medullary rim sign: ultrasonographic evidence of renal disease. **Vet Radiol Ultrasound**. 1992 ; 33 : 286-290. doi: h10.1111/j.1740-8261.1992.tb00145.x.

**BRASILEISH. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina.** Disponível em:

<[https://www.brasileish.com.br/assets/files/DIRETRIZES\\_Brasileish\\_2.pdf](https://www.brasileish.com.br/assets/files/DIRETRIZES_Brasileish_2.pdf)>. Acesso em: 8 out. 2022.

Brito V. N. et al. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2014 Nov;109(7):899-904. doi: 10.1590/0074-0276140112.

Campos-Neto A, Abeijon C. Urine-Based Antigen (Protein) Detection Test for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Microorganisms**. 2020 Oct 28;8(11):1676. doi: 10.3390/microorganisms8111676.

- Carvalho, C.F. **Ultrassonografia abdominal em pequenos animais**. 2º ed. Editora Roca, 468p. São Paulo, 2014.
- Chew, D. J.; Dibartola, S. P.; Shenck, P. A. Canine and feline nephrology and urology. 2. ed. Editora Elsevier, 534p, 2011.
- Cordella A. et al. Pey P, Dondi F, Dunn M, Caramazza C, Cipone M, Diana A. The ultrasonographic medullary "rim sign" versus medullary "band sign" in cats and their association with renal disease. **J Vet Intern Med**. 2020 Sep;34(5):1932-1939. doi: 10.1111/jvim.15878.
- Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Vet Pathol**. 2003 Nov;40(6):677-84. doi: 10.1354/vp.40-6-677.
- Costa D. J. et al. Experimental infection of dogs with Leishmania and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS One**. 2013;8(4):e60535. doi: 10.1371/journal.pone.0060535.
- Desjeux P. Leishmaniasis. **Nat Rev Microbiol**. 2004 Sep;2(9):692. doi: 10.1038/nrmicro981.
- Doerr K. A. et al. Calcinosis cutis in dogs: histopathological and clinical analysis of 46 cases. **Vet Dermatol**. 2013 Jun;24(3):355-61, e78-9. doi: 10.1111/vde.12026.
- Farahmand M, Nahrevanian H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. **Iran Biomed J**. 2016 Jul;20(3):128-34. doi: 10.7508/ibj.2016.03.001.
- Ferreira A. et al. Prevalence and clinical significance of the medullary rim sign identified on ultrasound of feline kidneys. **Vet Rec**. 2020 May 16;186(16):533. doi: 10.1136/vr.105619.
- García-Martínez J. D. et al. Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. **Res Vet Sci**. 2015 Apr;99:204-7. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.01.002.
- Ghosh P. et al. Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors**. 2016 Jul 4;9(1):383. doi: 10.1186/s13071-016-1667-2.
- Giunchetti R. C. et al. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Vet Parasitol**. 2019 Jul;271:87-97. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.05.006.
- Gómez-Ochoa P, et al. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **Veterinary Journal** 2009. 179 : 259–263. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.09.014.
- Grauer GF. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. **J Small Anim Pract**. 2005 Oct;46(10):469-78. doi: 10.1111/j.1748-5827.2005.tb00275.x.

Green, R.W. **The veterinarian and ultrasound**. In: \_\_\_\_\_. Small animal ultrasound. New York: Lippincott Williams and Wilkins, 1996. chap.1, p.1-7.

Guarga J. L. et al. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**. 2002 Sep 6;88(1-2):13-20. doi: 10.1016/s0165-2427(02)00128-9.

Hart D. V. et al. Ultrasound appearance of the outer medulla in dogs without renal dysfunction. **Vet Radiol Ultrasound**. 2013 Nov-Dec;54(6):652-8. doi: 10.1111/vru.12069.

Ibba F, Mangiagalli G, Paltrinieri S. Urinary gamma-glutamyl transferase (GGT) as a marker of tubular proteinuria in dogs with canine leishmaniasis, using sodium dodecylsulphate (SDS) electrophoresis as a reference method. **Vet J**. 2016 Apr;210:89-91. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.01.012.

**IRIS - International Renal Interest Society, 2019**. Disponível em: <<http://www.iris-kidney.com/index.html>>. Acesso em: 20 nov. 2022.

IRIS Canine GN Study Group Diagnosis Subgroup; Littman MP, Daminet S, Grauer GF, Lees GE, van Dongen AM. Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. **J Vet Intern Med**. 2013 Nov-Dec;27 Suppl 1:S19-26. doi: 10.1111/jvim.12223.

IRIS, International renal Interest Society. Staging of CKD (modified 2019). Acesso em 26 maio 2022. Disponível em: [http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS\\_Staging\\_of\\_CKD\\_modified\\_2019.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf)

Islam M. Z, et al. ELISA with recombinant rKRP42 antigen using urine samples: a tool for predicting clinical visceral leishmaniasis cases and its outbreak. **Am J Trop Med Hyg**. 2012 Oct;87(4):658-62. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0168.

Islam M. Z, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect urinary antibody against recombinant rKRP42 antigen made from *Leishmania donovani* for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**. 2008 Oct;79(4):599-604.

Jesus L. et al. Xanthinuria secondary to allopurinol treatment in dogs with leishmaniosis: Current perspectives of the Iberian veterinary community. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. 2022 Apr; 83:101783. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101783.

Kealy, J.K.; McAllister, H. Radiologia e ultrassonografia do cão e gato. 3.ed. São Paulo: Manole, 2005. p.7-18, 41-45, 96-135.

Lees G. E. et al. American College of Veterinary Internal Medicine. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). **J Vet Intern Med**. 2005 May-Jun;19(3):377-85. doi: 10.1892/0891-6640(2005)19[377:aamopi]2.0.co;2.

LEISHVET. **Canine and feline leishmaniosis a brief for the practicing veterinarian.** 5° Ed. 2022. Disponível em: <<https://www.leishvet.org/wp-content/uploads/2022/05/ALIVE-may22-web-EN.pdf>>.

Ling GV, Ruby AL. Aerobic bacterial flora of the prepuce, urethra, and vagina of normal adult dogs. **Am J Vet Res.** 1978 Apr;39(4):695-8. PMID: 646206.

Machado JR, et al. An overview of molecular mechanism of nephrotic syndrome. **Int J Nephrol.** 2012;2012:937623. doi: 10.1155/2012/937623.

Manna L. et al. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasit Vectors.** 2015 May 28;8:289. doi: 10.1186/s13071-015-0896-0.

Mantis P, Lamb C. R. Most dogs with medullary rim sign on ultrasonography have no demonstrable renal dysfunction. **Vet Radiol Ultrasound.** 2000 Mar-Apr;41(2):164-6. doi: 10.1111/j.1740-8261.2000.tb01471.x.

Mantis P, Lamb C. R. Most dogs with medullary rim sign on ultrasonography have no demonstrable renal dysfunction. **Vet Radiol Ultrasound.** 2000 Mar-Apr;41(2):164-6. doi: 10.1111/j.1740-8261.2000.tb01471.x.

Mattoon, J.S.; Nyland, T.G.; Auld, D.M. Técnicas de varredura abdominal por ultrassom. In: NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S. Ultrassom diagnóstico em pequenos animais. 2.ed. São Paulo: Roca, 2005. cap.2, p.53-85.

MCPHERSON, R. A. *Proteínas específicas.* In: HENRY, J. B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.* 18a ed. São Paulo: Manole. p.245-260. 1999.  
Medzhitov, R. Toll-like receptors e imunidade inata. **Nat Rev Immunol.** 2001. 1, 135–145. doi: 10.1038/35100529.

Miró G. et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. **Vet Dermatol.** 2009 Oct;20(5-6):397-404. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x.

Miró, G. et al. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasit Vectors.** 2011 Apr 13;4:52. doi: 10.1186/1756-3305-4-52.

Missawa N.A, Lima G.B.M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. **Rev Societ Bras Med Trop** 2006; 39(4): 337-340 doi: 10.1590/S0037-86822006000400004.

Myers, R. K.; McGavin, M. D. Respostas celulares e teciduais à lesão. In: McGavin, M. D.; Zachary, J. F. *Bases da Patologia Veterinária.* 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. P. 1-62.

Nagaoka F. et al. Detection of Urinary Antibodies and Its Application in Epidemiological Studies for Parasitic Diseases. **Vaccines (Basel)**. 2021 Jul 12;9(7):778. doi: 10.3390/vaccines9070778.

Nascimento LFM, Miranda DFH, Moura LD. et al. Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in *L. infantum*-infected dogs. **Vaccine X**. 2019 Nov 20;4:100048. doi: 10.1016/j.jvacx.2019.100048. PMID: 31891152; PMCID: PMC6928333.

Nautrup, C.P. Examination techniques. In: Natrup, C.P.; Tobias, R.; Cartee, R.E. An atlas and textbook of diagnostic ultrasonography of the dog and cat. Londres: Manson Publishing, 2001. chap.5, p.76-82.

Navarro, C. E. K., Manual de Urinálise Veterinária, São Paulo: Varela, pág. 89, 1996.

Nyland, T. G.; Mattoon, J. S. Trato Urinário. In: Nyland, T. G.; Mattoon, J. S. **Ultrason Diagnóstico em Pequenos Animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2005. p.161-198.

Noel LH. Morphological features of primary focal and segmental glomerulosclerosis. **Nephrol Dial Transplant**. 1999;14 Suppl 3:53-7. doi: 10.1093/ndt/14.suppl\_3.53. PMID: 10382983.

Oliveira HS. Renal and splenic evaluation B - mode and Doppler 432 ultrasonography of dogs naturally infected by visceral leishmaniasis. 2018. 58f. 433 Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 434 Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2018.

Paepe D. et al. Prospective evaluation of healthy Ragdoll cats for chronic kidney disease by routine laboratory parameters and ultrasonography. **J Feline Med Surg**. 2013 Oct;15(10):849-57. doi: 10.1177/1098612X13477415.

Paltrinieri S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Vet Clin Pathol**. 2016 Dec;45(4):552-578. doi: 10.1111/vcp.12413.

Peixoto, P. V. et al. Hipervitaminose D em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 573-594, 2012. doi: 10.1590/S0100-736X2012000700001.

Penninck, D.; D´anjou, M.A. Rins e ureteres. In: D´Anjou, M.A. Atlas de ultrassonografia de pequenos animais. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2011, p.337-362.

Plevraki K. et al. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in Canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **J Vet Intern Med**. 2006 Mar-Apr;20(2):228-33. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[228:eoatot]2.0.co;2.

Poli A. et al. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. **Nephron**. 1991;57(4):444-52. doi: 10.1159/000186348.

Polzin DJ. Diagnosing & staging of chronic kidney disease. In: Proceedings of 34th World Small Animal Veterinary Congress. 2009. São Paulo, Brasil. 2009. Acesso em 26 maio 2022. Disponível em:

<https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=4252604&pid=11290&>

Polzin, D.J. Chronic kidney disease. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Textbook of veterinary internal medicine. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. p.1756-1785.

Proverbio D. et al. Proteinuria reduction after treatment with miltefosine and allopurinol in dogs naturally infected with leishmaniasis. **Vet World**. 2016 Aug;9(8):904-8. doi: 10.14202/vetworld.2016.904-908.

Reis, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, 2006. v. 112, n. 3-4, p. 102-16, doi: 10.1016/j.vetimm.2006.02.001.

Ribeiro et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **Biomed Res Int**. 2018: 3296893. doi: 10.1155/2018/3296893.

Schell C, Huber TB. New players in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. **Nephrol Dial Transplant**. 2012 Sep;27(9):3406-12. doi: 10.1093/ndt/gfs273. Epub 2012 Jul 5. PMID: 22767631.

Serakides, R. Sistema urinário. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. Patologia Veterinária. São Paulo: Roca, 2011. P. 291-336.

Siems, J. Diagnostic ultrasound. In: Han, C.M.; Hurd, C.D. Practical diagnostic imaging. New York: Mosby, 2000. chap.9, p. 228-270.

Silva, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Rev Trop Ci Agr Biol**, v. 1, n. 1, p. 20, 2007.

Silva, K. R. et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2017. v. 112, n. 1, p. 53-63, doi: 10.1590 / 0074-02760160305.

Silveira, I. P. et al. Epidemiologia e distribuição de lesões extrarrenais de uremia em 161 cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 562-568, 2015. doi: 10.1590/S0100-2015000600013.

Singh D, et al. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region of India. **Am J Trop Med Hyg**. 2013 Feb;88(2):222-6. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0489.

Solano-Gallego L, et al. Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**. 2003 Sep;10(5):849-55. doi: 10.1128/cdli.10.5.849-855.2003.

Solano-Gallego L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol.** 2009 Oct 28;165(1-2):1-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

Solano-Gallego L. et al. The LeishVet Group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit Vectors.** 2011 May 20;4:86. doi: 10.1186/1756-3305-4-86.

Tabbabi A. Review of Leishmaniasis in the Middle East and North Africa. **Afr Health Sci.** 2019. 19(1): 1329–1337. doi: 10.4314/ahs.v19i1.4.

Teixeira Neto R. G. et al. Relationship of Leishmania-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Vet Parasitol.** 2010 May 11;169(3-4):248-57. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.01.023.

Thrall, Mary Anna et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

Todolí F, et al. Anti-Leishmania IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. **Vet Parasitol.** 2009 Jan 22;159(1):17-23. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.010.

Torres M. et al. Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. **J Small Anim Pract.** 2016 Jun;57(6):299-304. doi: 10.1111/jsap.12484.

Tripathi, N. K, Gregory, C. R., Latimer, K.S. Urinary system. In: LATIMER, K. S. Duncan & Prasse's Veterinary laboratory medicine: clinical pathology. 5. ed. Chichester: John Wiley Consumer , 2011. cap.9. p. 259.

Urnovitz H. B. et al. Urine-based diagnostic technologies. **Trends Biotechnol.** 1996 Oct;14(10):361-4. doi: 10.1016/0167-7799(96)10048-2.

Vac M. H. **Sistema Urinário: Rins, Ureteres, Bexiga Urinária e Uretra.** In: Carvalho, C. F. Ultra-Sonografia em Pequenos Animais. São Paulo: Roca, 2004. p.111-146.

Vaden SL. Glomerular disease. **Top Companion Anim Med.** 2011 Aug;26(3):128-34. doi: 10.1053/j.tcam.2011.04.003.

Vallur A. C. et al. Development and comparative evaluation of two antigen detection tests for Visceral Leishmaniasis. **BMC Infect Dis.** 2015 Sep 22;15:384. doi: 10.1186/s12879-015-1125-3.

Weese J. S, et al. International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary tract infections in dogs and cats. **Vet J.** 2019 May;247:8-25. doi: 10.1016/j.tvjl.2019.02.008.  
Werner, P. R. Acúmulos ou deposições de substâncias. In: \_\_\_\_\_. Patologia Geral Veterinária Aplicada. São Paulo: Roca, 2011. P. 103-144.



WHO. **Leishmaniose**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 8 out. 2022.

Zatelli A. et al. Glomerular lesions in dogs infected with Leishmania organisms. **Am J Vet Res**. 2003 May;64(5):558-61. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.558.

#### **4. CAPÍTULO II\***

---

\* Artigo elaborado de acordo com as normas do periódico “**Vaccine**” (Qualis A2, Fator de Impacto: 4,169).



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine: X

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

## Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in *L. infantum*-infected dogs



Leopoldo F.M. Nascimento<sup>a</sup>, Dayane Francisca Higino Miranda<sup>a</sup>, Luana D. Moura<sup>a</sup>, Flaviane A. Pinho<sup>b</sup>, Guilherme Loureiro Werneck<sup>c</sup>, Ricardo Khouri<sup>d,e</sup>, Steven G. Reed<sup>f,g</sup>, Malcolm S. Duthie<sup>f,g</sup>, Aldina Barral<sup>d,e,h</sup>, Manoel Barral-Netto<sup>d,e,h</sup>, Maria S.P. Cruz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Piauí, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Teresina, PI, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Salvador, BA, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Estudos em Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>d</sup> Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, BA, Brazil

<sup>e</sup> Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Salvador, BA, Brazil

<sup>f</sup> Infectious Diseases Research Institute, Seattle, WA 98102, USA

<sup>g</sup> HDT Biotech Corporation, Seattle, WA 98102, USA

<sup>h</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Instituto de Investigação em Imunologia, São Paulo, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 June 2019

Received in revised form 1 November 2019

Accepted 9 November 2019

Available online 20 November 2019

#### Keywords:

Canine visceral leishmaniasis

Vaccine

Parasite

Drug

Clinical signs

### ABSTRACT

There is little evidence that current control strategies for canine leishmaniasis (CanL), the veterinary disease caused by *L. infantum* infection, are having a positive impact. This is of critical importance because dogs are a primary reservoir for *L. infantum* and a significant source of parasite transmission to humans. Drugs intended primarily for human use are prohibited for the treatment of CanL because of concerns over the propagation of resistant parasites. Although allopurinol effectively decreases parasite burden in CanL, the treatment needs to be maintained for life. We hypothesized that during the allopurinol-induced parasite reduction dogs may become capable of developing a more robust immune response that may permit more effective control of parasites. To test this, we investigated the clinical and parasitological impact of short-term treatment with allopurinol, either alone or in combination with a defined sub-unit vaccine, on dogs naturally infected with *L. infantum*. A total of 28 dogs were distributed as follows: untreated; oral allopurinol alone (20 mg/kg, once each day for 90 days); or allopurinol with immunization with the Leish-F2 antigen formulated with the Toll-like receptor (TLR) 4 agonist Second generation Lipid Adjuvant (SLA) in stable emulsion (SE; SLA-SE). Dogs that did not receive treatment had a progressive decline in their clinical condition and an increase in their infection levels, while treatment with allopurinol alone alleviated the clinical symptoms of CanL but did not generate sustained reduction in parasites. Concomitant immunization with Leish-F2 + SLA-SE, however, improved clinical condition while also providing long-term clearance of *L. infantum* from lymphoid tissues and systemic organs. These results have important implications for both the management of CanL and for limiting *L. infantum* transmission to humans.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Observação: artigo em anexo no e-mail.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A progressão de sintomatologia e comprometimento de órgãos na leishmaniose canina são fatores importantes para avaliação do seu prognóstico, o surgimento da doença renal crônica é fator de prognóstico ruim e que necessita de monitoramento, uma vez que tanto a leishmaniose quanto a doença renal crônica (DRC) não têm cura, contudo necessitamos de uma terapêutica que possa abranger e melhorar os cães acometidos com leishmaniose, que conseqüentemente tenham desenvolvido DRC.

Embora existam protocolos imunoterapêuticos que demonstram ser capazes de induzir melhora clínica, ainda há um grande impasse quando se trata de obter a cura parasitológica, uma vez que os cães infectados por *L. infantum* continuam a ser reservatórios parasitários para vetores de flebotomíneos (GONÇALVES et al., 2019).

Nascimento et al., (2020), demonstraram que imunoterapia com uso da vacina Leish-F2 + SLA-SE associada com alopurinol, podem apresentar tanto melhora clínica como cura parasitológica, e que essa formulação utilizada é capaz de desenvolver uma resposta imune protetora e duradoura.

A continuação desse estudo (Nascimento et al., 2020) deu percurso quanto a importância de identificar biomarcadores renais que identifiquem precocemente lesão renal e possível surgimento de doença renal crônica em cães com leishmaniose, e vimos que alterações brandas em ultrassonografia, como sinal medular e a mineralização renal, além da detecção de proteínas na urina em ELISA semelhantes as vistas em EAS, não tão significativa em RPC, possam ser indicativos de precocidade de disfunção renal. O ELISA urinário é promissor, podendo ser considerado um marcador renal importante e bastante sensível na detecção de proteínas na urina de cães com leishmaniose que tendem a desenvolver DRC, além de que cães sem terapêutica tendem a apresentar lesões glomerulares e tubulointestinal mais evidente pelo histopatológico, como nefrite tubulointestinal e glomeruloesclerose o que pode levar à uma insuficiência renal. Nos nossos resultados sugerimos que a imunoterapia com vacina Leish-F2 + SLA-SE associada com alopurinol, além de melhora clínica e redução na carga parasitária já descrita, pode também causar uma nefroproteção, retardando surgimento de lesão renal em cães com leishmaniose.

## 6. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

- Abdalla, E.A. et al. Ultrasound findings in patients with Visceral Leishmaniasis. **International Journal of Medical Imaging**, v.2, n.1, p.5-9, 2014. doi: 10.11648/j.ijmi.20140201.12.
- Abeijon C, Campos-Neto A. Potential non-invasive urine-based antigen (protein) detection assay to diagnose active visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**. 2013 May 30;7(5):e2161. doi: 10.1371/journal.pntd.0002161.
- Acierno, M. J. et al. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. **J Vet Intern Med**. 2018 Nov;32(6):1803-1822. doi: 10.1111/jvim.15331.
- Adams W. H. et al. Early renal ultrasonographic findings in dogs with experimentally induced ethylene glycol nephrosis. **Am J Vet Res**. 1989 Aug;50(8):1370-6. PMID: 2675698.
- Adams WH, Toal RL, Breider MA. Ultrasonographic findings in dogs and cats with oxalate nephrosis attributed to ethylene glycol intoxication: 15 cases (1984-1988). **J Am Vet Med Assoc**. 1991 Aug 15;199(4):492-6. PMID: 1917665.
- Aguiar, P. H. P. et al. Clinical profile of naturally infected dogs from an endemic area for "Leishmania chagasi"(infantum) in Bahia state, Brazil, **Rev Bras Sau Prod An**, v. 8, n. 4, p. 283-294, 2007. ISSN 1519 9940.
- AlYousef A, AlSahow A, AlHelal B, Alqallaf A, Abdallah E, Abdellatif M, Nawar H, Elmahalawy R. Glomerulonephritis Histopathological Pattern Change. **BMC Nephrol**. 2020 May 18;21(1):186. doi: 10.1186/s12882-020-01836-3.
- Allahverdiyev et al. [Approaches and problems in vaccine development against leishmaniasis]. **Turkiye Parazitol Derg** 2010; 34(2):122-30. doi: 1085170SBAG-4007
- Alvar et al. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol**. 2004;57:1-88. doi: 10.1016/S0065-308X(04)57001-X.
- Alvar, J.; Yactayo, S. Bern, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**. 2006. 22 (21): 552-7. Doi: 10.1016/j.pt.2006.09.004.
- Alves E. B. et al. Effectiveness of insecticide-impregnated collars for the control of canine visceral leishmaniasis. **Prev Vet Med**. 2020 Sep; 182:105104. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105104.
- Alves, M. A .V. F. R. *Biomarcadores em Glomerulopatias*. In: ABENSUR,H. Biomarcadores da nefrologia. cap. 3. p. 37-40. 2011.
- Aresu L. et al. Light and electron microscopic analysis of consecutive renal biopsy specimens from leishmania-seropositive dogs. **Vet Pathol**. 2013 Sep;50(5):753-60. doi: 10.1177/0300985812459336.

Assis T. M. et al. Cost-effectiveness of a canine visceral leishmaniasis control program in Brazil based on insecticide-impregnated collars. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2020 Dec 11;53:e20200680. doi: 10.1590/0037-8682-0680-2020.

Athukuri BL, Neerati P. Enhanced Oral Bioavailability of Domperidone with Piperine in Male Wistar Rats: Involvement of CYP3A1 and P-gp Inhibition. **J Pharm Pharm Sci**. 2017;20:28-37. doi: 10.18433/J3MK72.

Baltazar P. I. et al. Comparative B-mode and Doppler renal ultrasonography with histopathological findings in dogs positive for canine visceral leishmaniasis. **Microsc Res Tech**. 2016 Jul;79(7):637-45. doi: 10.1002/jemt.22677.

Baneth, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**. 2008 Jul;24(7):324-30. doi: 10.1016/j.pt.2008.04.001.

Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol**. 2006 Jul;28(7):329-37. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x.

Barbieri, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol**, 2006. v. 28, n. 7, p. 329-37, doi: 10.1111 / j.1365-3024.2006.00840.x.

Barr F. J. et al. Hypercalcemic nephropathy in three dogs: sonographic appearance. **Veterinário Radiol** . 1989 ; 30 : 169-173. doi: 10.1111/j.1740-8261.1989.tb00770.x.

Barr, F.J.; Holt, P.E.; Gibbs, C. Ultrasonographic measurement of normal renal parameters. **Journal of Small Animal Practice**, 1990. v.31, n.4, p.180-184. doi: 10.1111/j.1748-5827.1990.tb00764.x

Bartges JW. Chronic kidney disease in dogs and cats. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**. 2012 Jul;42(4):669-92, vi. doi: 10.1016/j.cvsm.2012.04.008.

Baumgartner F, Boretti FS, Gerber B. Prognostic factors in dogs with common causes of proteinuria. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2022 Jul;164(7):525-533. **English**. doi: 10.17236/sat00362.

Baxarias et al., Immunotherapy in clinical canine leishmaniosis: a comparative update. 2019. **Res Vet Sci**. 125:218-226. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.06.009.

Belew AM, Barlett T, Brown SA. Evaluation of the white-coat effect in cats. **J Vet Intern Med**. 1999 Mar-Apr;13(2):134-42. doi: 10.1892/0891-6640(1999)013<0134:eotwce>2.3.co;2.

Benderitter T. et al. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**. 1988 Aug;82(4):335-41. doi: 10.1080/00034983.1988.11812255.

Bianciardi P, et al. Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys. **Toxicol Pathol**. 2009 Oct;37(6):770-5. doi: 10.1177/0192623309344088.

Biller D. S. Renal medullary rim sign: ultrasonographic evidence of renal disease. **Vet Radiol Ultrasound**. 1992 ; 33 : 286-290. doi: h10.1111/j.1740-8261.1992.tb00145.x.

Binns, S. H. et al. Doppler ultrasonographic, oscillometric sphygmomanometric, and photoplethysmographic techniques for noninvasive blood pressure measurement in anesthetized cats. **J Vet Intern Med**. 1995 Nov-Dec;9(6):405-14. doi: 10.1111/j.1939-1676.1995.tb03301.x.

Bongiorno G, et al. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs – a preliminary xenodiagnosis study. **Vet Parasitol** 2013; 197: 691–695. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.05.008.

Bongiorno G, et al. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs – a preliminary xenodiagnosis study. **Vet Parasitol** 2013; 197: 691–695. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.05.008.

Borja-Cabrera G.P, et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**. 2002. 20(27-28):3277-84. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00294-3.

Borja-Cabrera G.P. et al. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**. 2004. 22(17-18):2234-43. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.11.039.

Borja-Cabrera et al. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune (R) vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis 2009. **Vaccine** 28 (3) , 597-603 doi: 10.1016/j.vaccine.2009.09.071.

Bourdoiseau G, et al. Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs. **Vet Immunol Immunopathol**. 2009; 128(1-3):71-8. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.309.

Boyce MJ, Baisley KJ, Warrington SJ. Pharmacokinetic interaction between domperidone and ketoconazole leads to QT prolongation in healthy volunteers: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. **Br J Clin Pharmacol**. 2012 Mar;73(3):411-21. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.04093.x.

Branson KR, Wagner-Mann CC, Mann FA. Evaluation of an oscillometric blood pressure monitor on anesthetized cats and the effect of cuff placement and fur on accuracy. **Vet Surg**. 1997 Jul-Aug;26(4):347-53. doi: 10.1111/j.1532-950x.1997.tb01510.x.

**BRASILEISH. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina.** Disponível em:

<[https://www.brasileish.com.br/assets/files/DIRETRIZES\\_Brasileish\\_2.pdf](https://www.brasileish.com.br/assets/files/DIRETRIZES_Brasileish_2.pdf)>. Acesso em: 8 out. 2022.

- Brianti E, et al. Field evaluation of two different treatment approaches and their ability to control fleas and prevent canine leishmaniosis in a highly endemic area. **PLoS Negl Trop Dis** 2016; 10(9). doi: 10.1371 / journal.pntd.0004987.
- Brianti E. et al. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniosis. **Parasit Vectors**. 2014 Jul 14;7:327. doi: 10.1186/1756-3305-7-327.
- Brito V. N. et al. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2014 Nov;109(7):899-904. doi: 10.1590/0074-0276140112.
- Brown, S. A. Urolithiasis in Small Animals. MSD Manual, **Veterinary Manual**. 2013. Disponível em: <https://www.msdsvetmanual.com/urinary-system/noninfectious-diseases-of-the-urinary-system-in-small-animals/urolithiasis-in-small-animals>.
- Brown, S. et al. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. **J Vet Intern Med**. 2007 May-Jun;21(3):542-58. doi: 10.1892/0891-6640(2007)21[542:gftiea]2.0.co;2.
- Camargo J.B, et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. São Paulo, Brasil. **Rev Clín Vet** 2007; 71: 86-92.
- Campos-Neto A, Abeijon C. Urine-Based Antigen (Protein) Detection Test for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Microorganisms**. 2020 Oct 28;8(11):1676. doi: 10.3390/microorganisms8111676.
- Carcelén J, et al. The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. **Vaccine**. (2009) 27 (43) 5964–73. doi: 10.1016 / j.vaccine.2009.07.069.
- Carrió J, Portús M. In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. **BMC Pharmacol**. 2002 May 2;2:11. doi: 10.1186/1471-2210-2-11.
- Carvalho, C.F. **Ultrassonografia abdominal em pequenos animais**. 2º ed. Editora Roca, 468p. São Paulo, 2014.
- Cerna, P. et al. Comparison of Doppler ultrasonic and oscillometric devices (with or without proprietary optimisations) for non-invasive blood pressure measurement in conscious cats. **J Feline Med Surg**. 2021 Feb;23(2):121-130. doi: 10.1177/1098612X20932407.
- Chadban SJ, Atkins RC. Glomerulonephritis. **Lancet**. 2005 May 21-27;365(9473):1797-806. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66583-X.
- Chew, D. J.; Dibartola, S. P.; Shenck, P. A. Canine and feline nephrology and urology. 2. ed. Editora Elsevier, 534p, 2011.



Churg, J.; Bernstein, J.; Glassock, R. J. (1985) **Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Disease**. 2ª. Ed. New York: Igaku-Shoin. 541 p, 1985.

Cianciolo RE, Brown CA, Mohr FC, Spangler WL, Aresu L, van der Lugt JJ, Jansen JH, James C, Clubb FJ, Lees GE. Pathologic evaluation of canine renal biopsies: methods for identifying features that differentiate immune-mediated glomerulonephritides from other categories of glomerular diseases. **J Vet Intern Med**. 2013 Nov-Dec;27 Suppl 1:S10-8. doi: 10.1111/jvim.12226.

Cianciolo RE, Mohr FC, Aresu L, Brown CA, James C, Jansen JH, Spangler WL, van der Lugt JJ, Kass PH, Brovida C, Cowgill LD, Heiene R, Polzin DJ, Syme H, Vaden SL, van Dongen AM, Lees GE. World Small Animal Veterinary Association Renal Pathology Initiative: Classification of Glomerular Diseases in Dogs. **Vet Pathol**. 2016 Jan;53(1):113-35. doi: 10.1177/0300985815579996.

Cole L, Humm K, Dirrig H. Focused Ultrasound Examination of Canine and Feline Emergency Urinary Tract Disorders. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**. 2021 Nov;51(6):1233-1248. doi: 10.1016/j.cvsm.2021.07.007.

Coler R. N, et al. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. **Infect Immun**. 2002;70(8):4215–25. doi: 10.1128/IAI.70.8.4215-4225.2002.

Coler R. N, et al. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD(4+) T cells. **Infect Immun**. 2007;75(9):4648–54. doi: 10.1128 / IAI.00394-07.

Cordella A. et al. Pey P, Dondi F, Dunn M, Caramazza C, Cipone M, Diana A. The ultrasonographic medullary "rim sign" versus medullary "band sign" in cats and their association with renal disease. **J Vet Intern Med**. 2020 Sep;34(5):1932-1939. doi: 10.1111/jvim.15878.

Costa D. J. et al. Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS One**. 2013;8(4):e60535. doi: 10.1371/journal.pone.0060535.

Cowgill LD, Polzin DJ. Vision of the WSAVA renal standardization project. **J Vet Intern Med**. 2013 Nov-Dec;27 Suppl 1:S5-9. doi: 10.1111/jvim.12227.

Crivellenti & Giovaninni. **Tratado de Nefrologia e Urologia em Cães e Gatos**. 1ª ed. Editora MedVet, 824p. São Paulo, 2021.

Cunningham, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária - Fisiologia renal**. 3. ed. Editora Guanabara koogan, 579p. Rio de Janeiro, 2004.

Cuscó, A., et al. Non-synonymous genetic variation in exonic regions of canine toll-like receptors. **Canine Genet. Epidemiol**. 2014. 1:11. doi: 10.1186 / 2052-6687-1-11.

Da Silva V.O. et al. A Phase III trial of the effectiveness of the FML vaccine against canine kala azaris in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN) **Vaccine**. 2000; 19(9-10):1082-92. doi: 10.1016/s0264-410x(00)00339-x.

Dantas-Torres et al. Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. **Emerg Infect Dis**. 2019. 25(12): 1–4. doi: 10.3201/eid2512.190164.

Dantas-Torres F, Otranto D. Boas práticas para prevenir doenças transmitidas por vetores em cães e humanos . **Trends Parasitol** . (2016) 32 : 43–55. doi:10.1016 / j.pt.2015.09.004.

Dantas-Torres F. Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. **Int J Parasitol**. 2020. 50(3):171-176. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.01.001.

De Mendonça, L. Z. et al. Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors**. 2016. 9(1):472. doi: 10.1186/s13071-016-1752-6.

Dea-Ayuela MA. et al. Nucleotides and AHCC Enhance Th1 Responses In Vitro in *Leishmania*-Stimulated/Infected Murine Cells. **Molecules**. 2020 Aug 27;25(17):3918. doi: 10.3390/molecules25173918.

Desjeux P. Leishmaniasis. **Nat Rev Microbiol**. 2004 Sep;2(9):692. doi: 10.1038/nrmicro981.

Doerr K. A. et al. Calcinosis cutis in dogs: histopathological and clinical analysis of 46 cases. **Vet Dermatol**. 2013 Jun;24(3):355-61, e78-9. doi: 10.1111/vde.12026.

Duthie M.S, et al. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine** 2012; 30 : 134–141. doi: 10.1016 / j.vaccine.2011.11.005.

Duthie, M.S. et al. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine** 2012. 30 (2): 134-41. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.11.005.

Dyce, K. M.; Sack, W. O.; Wensing, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3. ed. Editora **Elsevier**, 813p. Rio de Janeiro, 2004.

Ellenport, C. R. Aparelho urogenital do carnívoro. In: GETTY, R.; SISSON, S.; GROSSMAN, J. D. Anatomia dos animais domésticos. 5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, 1986. Cap. 53, p. 1481-1493.

European Medicines Agency. **LetiFend: Summary of Product Characteristics**; 2016. (Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_of\\_the\\_public/veterinary/003865/WC500207742.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_of_the_public/veterinary/003865/WC500207742.pdf)).

Farahmand M, Nahrevanian H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. **Iran Biomed J.** 2016 Jul;20(3):128-34. doi: 10.7508/ibj.2016.03.001.

Farca A.M, et al. Leishmaniose canina: eficácia in vitro de miltefosina e marbofloxacina isoladamente ou em combinação com alopurinol contra cepas clínicas de *Leishmania infantum*. **Parasitol Res.** 2012. 110:2509–2513. doi: 10.1007 / s00436-011-2792-7.

Faria M.S., Reis F.C.G., Lima A.P.C.A. Toll-Like Receptors in *Leishmania* Infections: Guardians or Promoters? **J Parasitol Res.** 2012. v. 2012. doi: 10.1155/2012/930257.

Fernandes C. B. et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine** 2014; 32: 1287–1295. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.12.046.

Fernandes, A.P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. 2008. **Vaccine** 26 5888–5895. Doi: 10.1016/j.vaccine.2008.05.095.

Fernandez Cotrina J, et al. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend against canine leishmaniosis. **Vaccine** 2018; 36: 1972–1982. doi: 10.1016 / j.vaccine.2018.02.111.

Ferreira A. et al. Prevalence and clinical significance of the medullary rim sign identified on ultrasound of feline kidneys. **Vet Rec.** 2020 May 16;186(16):533. doi: 10.1136/vr.105619.

Ferrer, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. **Kirk's current veterinary therapy XI.** Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. Ed. 11º, p. 266-270.

Ferrer, L. Leishmaniasis: update in diagnosis and therapy. **Proceedings of European Society of Veterinary Dermatology**, PISA, p. 33-36, 1997.

Ferroglio E, Poggi M, Triscioglio A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. **Zoonoses Public Health.** 2008 Apr;55(3):145-8. doi: 10.1111/j.1863-2378.2007.01092.x.

Foglia Manzillo V, et al. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. **Vet Parasitol.** 2006 Nov 30;142(1-2):142-5. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.06.029.

Fonseca BN 2020. Comparação entre as vacinas Letifend® e CaniLeish® relativamente aos seus efeitos secundários em cães domésticos: um estudo retrospectivo [dissertação de mestrado]. Lisboa: FMV-Universidade de Lisboa.

Freitas, J. C. C. et al. Perfil de anticorpos anti-*leishmania* nas diferentes formas clínicas da leishmaniose canina. **In: 38º CONBRAVET - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Resumo)**. Santa Catarina, 2011.

Ferreira, P. C. ; Matera, J. M. Ureterolitíases obstrutivas em cães: avaliação da função renal na indicação da ureterotomia ou ureteronefrectomia. **Rev mv&z CRMV-SP**, v. 8, n.1, p.38-47, 2005. Disponível: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/3176#:~:text=F.%20de%3B%20MateraJ.,do%20CRMV%2DSP%2C%20v.>

García-Martínez J. D. et al. Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. **Res Vet Sci**. 2015 Apr;99:204-7. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.01.002.

Geddes, R. F. et al. The role of phosphorus in the pathophysiology of chronic kidney disease. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)**. 2013 Mar-Apr;23(2):122-33. doi: 10.1111/vec.12032.

Ghosh P. et al. Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors**. 2016 Jul 4;9(1):383. doi: 10.1186/s13071-016-1667-2.

Giunchetti R. C. et al. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Vet Parasitol**. 2019 Jul;271:87-97. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.05.006.

Gnjatic A., Sawhney N.B., Bhardwaj N. Toll-like receptor agonists: are they good adjuvants? **Cancer J**. 2010;16(4):382-91. doi: 10.1097/PPO.0b013e3181eaca65.

Gómez-Ochoa P, et al. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **Veterinary Journal** 2009. 179 : 259–263. doi: 10.1016 / j.tvjl.2007.09.014.

Gonçalves A.A.M et al. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. **Front Cell Infect Microbiol** . 2019; 9: 427. doi: 10.3389 / fcimb.2019.00427.

Gouni, V. et al. Influence of the observer's level of experience on systolic and diastolic arterial blood pressure measurements using Doppler ultrasonography in healthy conscious cats. **J Feline Med Surg**. 2015 Feb;17(2):94-100. doi: 10.1177/1098612X14532087.

Gradoni, L. Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 94–100, 28 fev. 2015. Doi: 0.1016 / j.vetpar.2015.01.003.

Grauer GF. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. **J Small Anim Pract**. 2005 Oct;46(10):469-78. doi: 10.1111/j.1748-5827.2005.tb00275.x.

- Grauer, G. Manifestações clínicas dos distúrbios urinários; Urolíase canina. In: Nelson, R & Couto, G. **Medicina Interna De Pequenos Animais**. 4ª. ed. Elsevier. Cap.41, p.611-616, 2010.
- Green, R.W. **The veterinarian and ultrasound**. In: \_\_\_\_\_. Small animal ultrasound. New York: Lippincott Williams and Wilkins, 1996. chap.1, p.1-7.
- Grimaldi G, Jr. et al. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLoS ONE**. (2017) 12(9). doi: 10.1371 / journal.pone.0185438.
- Guarga J. L. et al. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**. 2002 Sep 6;88(1-2):13-20. doi: 10.1016/s0165-2427(02)00128-9.
- Guerra, M.G. Urolitíase no trato urinário inferior em cães: revisão de literatura. 2018 Disponível: <http://dspace.unisa.br/handle/123456789/315>.
- Hall, J. A. et al. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides. **Vet J**. 2014 Dec;202(3):588-96. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.10.021.
- Hall, J. A. et al. Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine in Dogs with Naturally Occurring Chronic Kidney Disease. **J Vet Intern Med**. 2016 May;30(3):794-802. doi: 10.1111/jvim.13942.
- Hart D. V. et al. Ultrasound appearance of the outer medulla in dogs without renal dysfunction. **Vet Radiol Ultrasound**. 2013 Nov-Dec;54(6):652-8. doi: 10.1111/vru.12069.
- Hinterberger-Fischer M. Prolactin as pro-inflammatory cytokine - considerations on consolidated immunotherapy after high dosage therapy. **Acta Med Austriaca Suppl**. 2000;52:16–20. PMID: 11261272.
- Ibba F, Mangiagalli G, Paltrinieri S. Urinary gamma-glutamyl transferase (GGT) as a marker of tubular proteinuria in dogs with canine leishmaniasis, using sodium dodecylsulphate (SDS) electrophoresis as a reference method. **Vet J**. 2016 Apr;210:89-91. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.01.012.
- Iborra et al. Vaccine candidates against leishmania under current research. **Expert Ver Vaccines**. 2018. 17(4):323-334. doi: 10.1080/14760584.2018.1459191.
- Ikeda-Garcia F. A. et al. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Vet Parasitol**. 2007 Feb 28;143(3-4):254-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.08.019.
- Ikeda-Garcia FA, Lopes RS, Ciarlini PC, Marques FJ, Lima VM, Perri SH, Feitosa MM. Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral

leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Res Vet Sci.** 2007 Aug;83(1):105-8. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.10.008.

Ikeda-Garcia, F. A. et al. (2010). Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate and allopurinol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 47(3), 218-223. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.08.019.

IRIS Canine GN Study Group Diagnosis Subgroup; Littman MP, Daminet S, Grauer GF, Lees GE, van Dongen AM. Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. **J Vet Intern Med.** 2013 Nov-Dec;27 Suppl 1:S19-26. doi: 10.1111/jvim.12223.

**IRIS - International Renal Interest Society, 2023.** Disponível em: <http://iris-kidney.com/pdf/2\_IRIS\_Staging\_of\_CKD\_2023.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2023.

Islam M. Z, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect urinary antibody against recombinant rKRP42 antigen made from *Leishmania donovani* for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** 2008 Oct;79(4):599-604.

Islam M. Z, et al. ELISA with recombinant rKRP42 antigen using urine samples: a tool for predicting clinical visceral leishmaniasis cases and its outbreak. **Am J Trop Med Hyg.** 2012 Oct;87(4):658-62. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0168.

Jain k, Jain N K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **J Immunol Methods.** 2015; 422:1-12. doi: 10.1016/j.jim.2015.03.017.

Jericó, M. M. et al. **Tratado de medicina interna de cães e gatos - Doença Renal Crônica.** 1º ed. Editora Roca, 2464p. São Paulo, 2015.

Jesus L. et al. Xanthinuria secondary to allopurinol treatment in dogs with leishmaniasis: Current perspectives of the Iberian veterinary community. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** 2022 Apr; 83:101783. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101783.

Jones, T. C.; Hunt, R. D.; King, N. W. Sistema urinário. In: \_\_. **Patologia veterinária.** 6. ed. Sao Paulo: Manole, 2000. cap. 24, p. 1131-1168.

Joshi S, et al. Visceral leishmaniasis: advances in vaccine development through classical and molecular approaches. **Front Immunol.** 2014; 5:380. doi: 10.3389/fimmu.2014.00380.

Kealy, J. K. O abdomen. In: Kealy, J. K.; McAllister, H.; Graham, J. P. Radiografia e Ultrassonografia do Cão e do Gato. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p.126-172.

Kealy, J.K.; McAllister, H. Radiologia e ultrassonografia do cão e gato. 3.ed. São Paulo: Manole, 2005. p.7-18, 41-45, 96-135.

Kitano, H. & Oda, K. Robustness trade-offs and host-microbial symbiosis in the immun system. **Mol. Syst. Biol.** 2, doi: 10.1038 / msb4100039.

Kleine K. F. S. **Guia Prático de Nefrologia em Cães e Gatos**. 1ª ed. Editora L. F. Livros, 272p. Rio de Janeiro, 2014.

Koehler L. A. et al. Canine uroliths: frequently asked questions and their answers. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**. 2009 Jan;39(1):161-81. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.09.007.

Kogika, M. M., Waki, M. F. Infecção do Trato Urinário de Cães. In: Jerico, M. M., Andrade Neto, J. P., KOGIKA, M. M. Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos. Rio de Janeiro: Roca; 2015. p. 4436-4462.

Konig H. E.; Liebich H. G. **Anatomia dos animais domésticos: Texto e atlas colorido**. vol. 2, Editora Artmed, 206p. Porto Alegre, 2004.

Koutinas A. F., Koutinas C. K. Pathological mechanisms underlying clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum* / *chagasi*. **Vet Pathol**. 2014. 51, 527-538. doi: 10.1177/0300985814521248.

Koutinas A.F, et al. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Vet Parasitol** 2001. 98(4): 247–261. doi: 10.1016/s0304-4017(01)00399-5.

Lang, J. Urinary tract. In: Mannion, P. Diagnostic ultrasound in small animal practice, Blackwell Publishing Company, p. 109-144, 2006.

Lees, G. E. et al. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). *J Vet Intern Med*. 2005 May-Jun;19(3):377-85. doi: 10.1892/0891-6640(2005)19[377:aamopi]2.0.co;2.

LEISHVET. **Canine and feline leishmaniosis a brief for the practicing veterinarian**. 5º Ed. 2022. Disponível em: <<https://www.leishvet.org/wp-content/uploads/2022/05/ALIVE-may22-web-EN.pdf>>. Acesso em: 8 out. 2022.

Lemesre J. L. et al. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: doubleblind randomised efficacy field trial. **Vaccine**. 2007; 25: 4223–4234. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.02.083.

Lemesre J.L, et al. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: doubleblind randomised efficacy field trial. **Vaccine** 2007; 25: 4223–4234. doi: 10.1016 / j.vaccine.2007.02.083.

Ling GV, Ruby AL. Aerobic bacterial flora of the prepuce, urethra, and vagina of normal adult dogs. **Am J Vet Res**. 1978 Apr;39(4):695-8. PMID: 646206.

Lopes E.G, et al. Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of *Leishmania* infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis, in Brazil. **Epidemiol Infect** . (2018) 146 : 401–6. doi: 10.1017 / S0950268817003053.

Lees G. E. et al. American College of Veterinary Internal Medicine. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). **J Vet Intern Med.** 2005 May-Jun;19(3):377-85. doi: 10.1892/0891-6640(2005)19[377:aamopi]2.0.co;2.

Lulich, J. P. et al. **Distúrbios do trato urinário inferior dos caninos.** In: Ettinger, S. J.; Feldman, E. C. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 5ª ed, vol. 2, São Paulo: Manole, p. 1841-1867, 2008.

Luna, E.J.A.; Campos, S.R.S.L.C. Vaccine development against neglected tropical diseases. 2020. **Cad. Saúde Pública.** 36 Sup 2. doi: 10.1590/0102-311X00215720.

Lunn K. F. The kidney in critically ill small animals. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** 2011 Jul;41(4):727-44, vi. doi: 10.1016/j.cvsm.2011.03.020.

Machado JR, et al. An overview of molecular mechanism of nephrotic syndrome. **Int J Nephrol.** 2012;2012:937623. doi: 10.1155/2012/937623.

Machado C. J. S, Silva E. G, Vilani R. M. Use of an instrument of controversial public health policy: euthanasia of dogs contaminated by leishmaniasis in Brazil. **Saúde Soc.** São Paulo, v.25, n.1, p.247-258, 2016. doi: 10.1590/S0104-12902016146918.

Macphail, M.C. Cirurgia do Rim e Ureter. In: FOSSUM, W.T. **Cirurgia de pequenos animais.** 4ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap.25 p.726-729, 2014.

Maia-Elkhoury A. N. S. et al. Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios, **Cad Saúde Pub,** v. 24, n. 12, p. 2941-2947; 2008.

Manna L. et al. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasit Vectors.** 2015 May 28;8:289. doi: 10.1186/s13071-015-0896-0.

Manna, L. et al. Evidence for a relationship between Leishmania load and clinical manifestations. **Res Vet Sci,** 2009. v. 87, n. 1, p. 76-8, doi: 10.1016 / j.rvsc.2008.12.009.

Mantis P, Lamb C. R. Most dogs with medullary rim sign on ultrasonography have no demonstrable renal dysfunction. **Vet Radiol Ultrasound.** 2000 Mar-Apr;41(2):164-6. doi: 10.1111/j.1740-8261.2000.tb01471.x.

Marino, C. L. et al. White-coat effect on systemic blood pressure in retired racing Greyhounds. **J Vet Intern Med.** 2011 Jul-Aug;25(4):861-5. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.00735.x.

Martin V, et al. The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) remains effective against an experimental challenge one year later. **Vet Res** 2014; 45: 1–15. doi: 10.1186 / 1297-9716-45-69.



Marzochi, M. C. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 1985. v. 80, n. 3, p. 349-57, doi: 10.1590/S0074-02761985000300012.

Matias, E.P. et al. Efeitos adversos da vacina LEISH-TEC® em cães soronegativos para Leishmaniose Visceral. 2020. **Brazilian Journal of Development**. v. 6, n. 7, p. 53019-53028. Doi: 10.34117/bjdv6n7-810. doi:10.34117/bjdv6n7-810.

Mattoon, J.S.; Nyland, T.G.; Auld, D.M. Técnicas de varredura abdominal por ultrassom. In: NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S. Ultrassom diagnóstico em pequenos animais. 2.ed. São Paulo: Roca, 2005. cap.2, p.53-85.

MCPHERSON, R. A. *Proteínas específicas*. In: HENRY, J. B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 18a ed. São Paulo: Manole. p.245-260. 1999.  
Medzhitov, R. Toll-like receptors e imunidade inata. **Nat Rev Immunol**. 2001. 1, 135–145. doi: 10.1038/35100529.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO E  
MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica Conjunta N.º 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA/MS**. Brasília: DF, MAPA, 2016.  
MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. **Nota Técnica Conjunta N.º 01/2011 CGDTCGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Brasília: DF, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Gabinete do Ministro. **Portaria Interministerial N° 1.426 DE 11 DE JULHO DE 2008**. Disponível em:  
[http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/outras\\_normas/porta1426.pdf](http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/outras_normas/porta1426.pdf). Acesso em: 1 dez. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1º ed., 5º Reimpressão. Brasília, DF; 2014.

Miró G. et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. **Vet Dermatol**. 2009 Oct;20(5-6):397-404. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x.

Miró, G. et al. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasit Vectors**. 2011 Apr 13;4:52. doi: 10.1186/1756-3305-4-52.

Missawa N.A, Lima G.B.M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop** 2006; 39(4): 337-340 doi: 10.1590/S0037-86822006000400004.

Mohammad D, Baracco R. Postinfectious Glomerulonephritis. **Pediatr Ann**. 2020 Jun 1;49(6):e273-e277. doi: 10.3928/19382359-20200519-01.

Molano I, et al. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. **Vet Immunol Immunopathol** 2003; 92: 1–13. doi: 10.1016/s0165-2427(02)00315-x.

Moreno J, et al. Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. **PLoS Negl Trop Dis.** (2012) 6 (6). doi: 10.1371 / journal.pntd.0001683.

Moreno J. Assessment of Vaccine-Induced Immunity Against Canine Visceral Leishmaniasis. **Front Vet Sci.** 2019. 6: 168. doi: 10.3389/fvets.2019.00168.

Mutiso, J.M. et al. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. **Biomed. Res.** 2013. 27, 85–102. doi: 10.7555 / JBR.27.20120064.

Myers, R. K.; McGavin, M. D. Respostas celulares e teciduais à lesão. In: McGavin, M. D.; Zachary, J. F. Bases da Patologia Veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. P. 1-62.

Nabity, M. B. et al. Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. **J Vet Intern Med.** 2015 Jul-Aug;29(4):1036-44. doi: 10.1111/jvim.12835.

Nagaoka F. et al. Detection of Urinary Antibodies and Its Application in Epidemiological Studies for Parasitic Diseases. **Vaccines (Basel).** 2021 Jul 12;9(7):778. doi: 10.3390/vaccines9070778.

Nascimento et al. Novos adjuvantes vacinais: importante ferramenta para imunoterapia da leishmaniose visceral. 2018. **HU Revista.** v. 44, n. 3, p. 401-410. doi: 10.34019/1982-8047.2018.v44.14123.

Nascimento LFM, Miranda DFH, Moura LD. et al. Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in *L. infantum*-infected dogs. **Vaccine X.** 2019 Nov 20;4:100048. doi: 10.1016/j.jvacx.2019.100048. PMID: 31891152; PMCID: PMC6928333.

Nautrup, C.P. Examination techniques. In: Nautrup, C.P.; Tobias, R.; Cartee, R.E. An atlas and textbook of diagnostic ultrasonography of the dog and cat. Londres: Manson Publishing, 2001. chap.5, p.76-82.

Navarro, C. E. K., Manual de Urinálise Veterinária, São Paulo: Varela, pág. 89, 1996.

Nelson, R.W.; Couto, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais.** Rio de Janeiro, Ed. Elsevier, 4a Edição, cap.46, p.670-679, 2010.

Nogueira F.S, et al. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine.** 2005. 23(40):4805-10. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.05.011.

Nyland, T. G.; Mattoon, J. S. Trato Urinário. In: Nyland, T. G.; Mattoon, J. S. *Ultrasono Diagnóstico em Pequenos Animais*. 2 ed. São Paulo: Roca, 2005. p.161-198.

Nyland, T. G.; Widmer, W. R.; Matton, J. S. Urinary Tract. In: Matton, J. S.; Nyland, T.G. *Small Animal Diagnostic Ultrasound*. 3 ed. St.Louis: Elseve Saunders, 2015, p.557-601.

Oliva G, et al. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. **PLoS Negl Trop Dis**. 2014; 8 (10). doi: 10.1371/journal.pntd.0003213.

Oliveira HS. Renal and splenic evaluation B - mode and Doppler 432 ultrasonography of dogs naturally infected by visceral leishmaniasis. 2018. 58f. 433 Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 434 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2018.

Osborne C. A. et al. Analysis of 451,891 canine uroliths, feline uroliths, and feline urethral plugs from 1981 to 2007: perspectives from the Minnesota Urolith Center. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**. 2009 Jan;39(1):183-97. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.09.011.

Osborne C. A. et al. Paradigm changes in the role of nutrition for the management of canine and feline urolithiasis. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**. 2009 Jan;39(1):127-41. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.10.001.

Otranto D, Dantas-Torres F. A prevenção da leishmaniose canina e seu impacto na saúde pública. **Tendências Parasitol**. 2013; 29:339-345. doi: 10.1016/j.pt.2013.05.003.

Otranto D. et al. Prevenção da leishmaniose canina em área hiperendêmica usando uma combinação de 10% de imidacloprida/4,5% de flumetrina. **PLoS One**. 2013;8: e56374. pmid:23451043.

Oyafuso, M. K. Urolitíase em Cães: avaliação quantitativa da composição mineral de 156 urólitos. **Ciência Rural**, v.40, n.1, p.102-108, 2010. doi: 10.1590/S0103-84782010000100017.

Paeppe D. et al. Prospective evaluation of healthy Ragdoll cats for chronic kidney disease by routine laboratory parameters and ultrasonography. **J Feline Med Surg**. 2013 Oct;15(10):849-57. doi: 10.1177/1098612X13477415.

Paltrinieri S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Vet Clin Pathol**. 2016 Dec;45(4):552-578. doi: 10.1111/vcp.12413.

Parker VJ, Freeman LM. Association between body condition and survival in dogs with acquired chronic kidney disease. **J Vet Intern Med**. 2011 Nov-Dec;25(6):1306-11. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.00805.x.

Peixoto, P. V. et al. Hipervitaminose D em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 573-594, 2012. doi: 10.1590/S0100-736X2012000700001.

- Penninck, D.; D'anjou, M.A. Rins e ureteres. In: D'Anjou, M.A. Atlas de ultrassonografia de pequenos animais. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2011, p.337-362.
- PereiraI. S. et al. Achados ultrassonográficos renais em cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* chagasi. **Rev mv&z CRMV-SP**, v. 17, n. 1, p. 53-53, 8 maio 2019 Disponível em: <https://www.revistamvez-crmvz.com.br/index.php/recmvz/article/view/37846>
- Petitdidier E, et al. Vacina à base de peptídeo induz com sucesso imunidade protetora contra leishmaniose visceral canina. **NPJ De Vacinas**. 2019; 4:49. doi: 10.1038/s41541-019-0144-2.
- Pixel, D. Fundamentos da ultrassonografia em ginecologia e obstetrícia. Campinas. 2016. Disponível em: <https://drpixel.fcm.unicamp.br/conteudo/fundamentos-da-ultrassonografia-em-ginecologia-e-obstetricia>. Acesso em: 15 Jul. 2022.
- Plevraki K. et al. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in Canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **J Vet Intern Med**. 2006 Mar-Apr;20(2):228-33. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[228:eoatot]2.0.co;2.
- Pocai, E. A. et al. Visceral Leishmaniasis (kalaazar): five cases in dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul, South Brazil. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998. doi: 10.1590/S0103-84781998000300025.
- Poli A. et al. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. **Nephron**. 1991;57(4):444-52. doi: 10.1159/000186348.
- Pollard, R. E. & Phillips, K. L. (2017). Diagnostic imaging of the urinary tract. In J. Elliott, G. F. Grauer & J. L. Westropp (Ed.), **BSAVA Manual of canine and feline nephrology and urology** (3rd ed.). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association. 7:84-115.
- Polzin DJ. Diagnosing & staging of chronic kidney disease. In: Proceedings of 34th World Small Animal Veterinary Congress. 2009. São Paulo, Brasil. 2009. Acesso em 26 maio 2022. Disponível em: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=4252604&pid=11290&>
- Polzin, D.J. Chronic kidney disease. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Textbook of veterinary internal medicine. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. p.1756-1785.
- Poot J, et al. Vaccination of dogs with six different candidate leishmaniasis vaccines composed of a chimerical recombinant protein containing ribosomal and histone protein epitopes in combination with different adjuvants. **Vaccine** 2009; 27: 4439–4446. doi: 10.1016 / j.vaccine.2009.05.043.
- Proverbio D. et al. Proteinuria reduction after treatment with miltefosine and allopurinol in dogs naturally infected with leishmaniasis. **Vet World**. 2016 Aug;9(8):904-8. doi: 10.14202/vetworld.2016.904-908.

Proverbio D. et al. Relationship between Leishmania IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. **Biomed Res Int.** 2014; 2014:412808. doi: 10.1155/2014/412808.

Queiroz, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2010. v. 19, n. 1, p. 32-38, doi: 10.4322/rbpv.01901006.

Raditic DM. Complementary and integrative therapies for lower urinary tract diseases. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** 2015 Jul;45(4):857-78. doi: 10.1016/j.cvsm.2015.02.009.

Raman, V.S. et al. Adjuvants for Leishmania vaccines: from models to clinical application. **Front. Immunol.** 2012. 3, 144. doi: 10.3389 / fimmu.2012.00144.

Reddymasu SC, Soykan I, McCallum RW. Domperidone: review of pharmacology and clinical applications in gastroenterology. **Am J Gastroenterol.** 2007 Sep;102(9):2036-45. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01255.x.

Reece W. O.; Dukes H. H. **Fisiologia dos Animais Domésticos** . . 13º ed. Editora Roca, 740p. São Paulo, 2017.

Reed S.G, et al. Development of a leishmaniasis vaccine: the importance of MPL. **Expert Rev Vaccines.** 2003;2(2):239–52. doi: 10.1586 / 14760584.2.2.239.

Regina-Silva S, et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine** . (2016) 34:2233–9. 10.1016 / j.vaccine.2016.03.019.

Reis A.B. et al. Imunidade à Leishmania e a busca racional por vacinas contra a leishmaniose canina. **Tendências Parasitol.** 2010; 26(7):341-9. doi: 10.1016/j.pt.2010.04.005.

Reis, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. **Vet Immunol Immunopathol**, 2006. v. 112, n. 3-4, p. 102-16, doi: 10.1016/j.vetimm.2006.02.001.

Ribeiro et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **Biomed Res Int.** 2018: 3296893. doi: 10.1155/2018/3296893.

Ribeiro N. A. S. Infecção do trato urinário inferior em cães. Revisão de literatura. **Rev mv&z CRMV-SP**, v. 9, n. 1, p. 38-41, 1 jan. 2011. Disponível: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/393#:~:text=Alguns%20autores%20relatam%20que%20a,infec%C3%A7%C3%A3o%20do%20trato%20urin%C3%A1rio%20inferior.>

- Ribeiro, V. M. Milteforan® o aliado dos cães contra leishmaniose visceral no Brasil. **Rev V&Z Minas**. n. 131, p. 44-46, 2016.
- Roatt B.M, et al. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Front Immunol**. 2014; 5: 272. doi: 10.3389/fimmu.2014.00272.
- Rogers K. D. et al. Composition of uroliths in small domestic animals in the United Kingdom. **Vet J**. 2011 May;188(2):228-30. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.022.
- Santos F. N. et al. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune® vaccine. **Vaccine**. 2007. 25(33): 6176–6190. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.06.005.
- Santos, J. P. D. et al. Histological changes and immunolabeling of *Leishmania infantum* in kidneys and urinary bladder of dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 420-423, 2013. doi: 10.1590/S1984-29612013000300017.
- Saraiva, E. M. et al. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. 2006. **Vaccine**. 20;24(13):2423-31. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.11.061.
- Schimming, B. C.; Pinto & Silva, J. R. C. Leishmaniose Visceral Canina – Revisão de literatura. **Rev Cient Elet Med Vet**. 2012. ISSN: 1679-7353; ano x – n. 19.
- Scott, P. et al. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. **Immunol Rev**. 2004 Oct; 201:318-38. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00198.x.
- Segarra S. et al. Prevention of disease progression in *Leishmania infantum*-infected dogs with dietary nucleotides and active hexose correlated compound. **Parasit Vectors**. 2018 Feb 21;11(1):103. doi: 10.1186/s13071-018-2705-z.
- Segarra S. et al. Randomized, allopurinol-controlled trial of the effects of dietary nucleotides and active hexose correlated compound in the treatment of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**. 2017 May 30;239:50-56. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.04.014.
- Segarra S. Nutritional Modulation of the Immune Response Mediated by Nucleotides in Canine Leishmaniasis. **Microorganisms**. 2021 Dec 16;9(12):2601. doi: 10.3390/microorganisms9122601.
- SERAKIDES, R. Sistema urinário. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. Patologia Veterinária. São Paulo: Roca, 2011. P. 291-336.
- Siems, J. Diagnostic ultrasound. In: Han, C.M.; Hurd, C.D. Practical diagnostic imaging. New York: Mosby, 2000. chap.9, p. 228-270.
- Silva et al. Cálculo vesical e nefrolitíase bilateral: relato de caso. **Pubvet**, v. 9, n.2, p. 76-78, 2015. ISSN: 1982-1263.

- Silva J. G. D. et al. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil, **Cad Saúde Públ**, 2007. v. 23, n 7, p. 1715-1720, doi: 10.1590/S0102-311X2007000700024.
- Silva, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Rev Trop Ci Agr Biol**, v. 1, n. 1, p. 20, 2007.
- Silva, K. R. et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2017. v. 112, n. 1, p. 53-63, doi: 10.1590 / 0074-02760160305.
- Silveira, I. P. et al. Epidemiologia e distribuição de lesões extrarrenais de uremia em 161 cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 562-568, 2015. doi: 10.1590/S0100-2015000600013.
- Singh D, et al. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region of India. **Am J Trop Med Hyg**. 2013 Feb;88(2):222-6. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0489.
- Solano-Gallego L, et al. Detection of anti-Leishmania immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**. 2003 Sep;10(5):849-55. doi: 10.1128/cdli.10.5.849-855.2003.
- Solano-Gallego L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**. 2009 Oct 28;165(1-2):1-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.
- Solano-Gallego L. et al. The LeishVet Group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasit Vectors**. 2011 May 20;4:86. doi: 10.1186/1756-3305-4-86.
- Sørensen T. M. et al. Pre-test probability of urinary tract infection in dogs with clinical signs of lower urinary tract disease. **Vet J**. 2019 May;247:65-70. doi: 10.1016/j.tvjl.2019.03.003.
- Sosnar M, Bulkova T, Ruzicka M. Epidemiology of canine urolithiasis in the Czech Republic from 1997 to 2002. **J Small Anim Pract**. 2005 Apr;46(4):177-84. doi: 10.1111/j.1748-5827.2005.tb00308.x.
- Steinhagen et al. TLR-based immune adjuvants. **Vaccine**. 2011. v. 29, p. 3341-3355. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.08.002.
- Tabbabi A. Review of Leishmaniasis in the Middle East and North Africa. **Afr Health Sci**. 2019 Mar;19(1):1329-1337. doi: 10.4314/ahs.v19i1.4.
- Teixeira Neto R. G. et al. Relationship of Leishmania-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**. 2010 May 11;169(3-4):248-57. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.01.023.

Testasica M. C. et al. Antibody responses induced by Leish-Tec, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Vet Parasitol** 2014; 204: 169–176. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.04.025.

Thrall, Mary Anna et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

Tizard, I. R. **Imunologia veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 15, p.162.

Todolí F, et al. Anti-Leishmania IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. **Vet Parasitol**. 2009 Jan 22;159(1):17-23. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.010.

Toepp A, et al. Safety analysis of Leishmania vaccine used in a randomized canine vaccine/ immunotherapy trial. **Am J Trop Med Hyg**. 2018; 98: 1332– 1338. doi: 10.4269/ajtmh.17-0888.

Torres M. et al. Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. **J Small Anim Pract**. 2016 Jun;57(6):299-304. doi: 10.1111/jsap.12484.

Torres, F.D. et al. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. 2006. **Vet Parasitol**. 10;141(1-2):1-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.05.001.

Travi BL, Miró G. Use of domperidone in canine visceral leishmaniasis: gaps in veterinary knowledge and epidemiological implications. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2018 Oct 18;113(11):e180301. doi: 10.1590/0074-02760180301.

Trigo, J, et al. Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f + MPL-SE. **Vaccine**. 2010. 28, 3333–3340. doi: 10.1016 / j.vaccine.2010.02.089.

Tripathi, N. K, Gregory, C. R., Latimer, K.S. Urinary system. In: LATIMER, K. S. Duncan & Prasse's Veterinary laboratory medicine: clinical pathology. 5. ed. Chichester: John Wiley Consumer , 2011. cap.9. p. 259.

Ulrich L. K. et al. Changing paradigms in the frequency and management of canine compound uroliths. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**. 2009 Jan;39(1):41-53. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.09.009.

Urnovitz H. B. et al. Urine-based diagnostic technologies. **Trends Biotechnol**. 1996 Oct;14(10):361-4. doi: 10.1016/0167-7799(96)10048-2.

Vac M. H. **Sistema Urinário: Rins, Ureteres, Bexiga Urinária e Uretra**. In: Carvalho, C. F. Ultra-Sonografia em Pequenos Animais. São Paulo: Roca, 2004. p.111-146.

Vaden SL. Glomerular disease. **Top Companion Anim Med**. 2011 Aug;26(3):128-34. doi: 10.1053/j.tcam.2011.04.003.



- Vallur A. C. et al. Development and comparative evaluation of two antigen detection tests for Visceral Leishmaniasis. **BMC Infect Dis.** 2015 Sep 22;15:384. doi: 10.1186/s12879-015-1125-3.
- Van Noord C. et al. Domperidone and ventricular arrhythmia or sudden cardiac death: a population-based case-control study in the Netherlands. **Drug Saf.** 2010 Nov 1;33(11):1003-14. doi: 10.2165/11536840-000000000-00000.
- Velez I.D, et al. Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis. **Vaccine.** 2009 doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.045.
- Velez R. et al. Evaluation of canine leishmaniosis vaccine CaniLeish® under field conditions in native dog populations from an endemic Mediterranean area-A randomized controlled trial. **Acta Trop.** 2020 May;205:105387. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105387.
- Velez, R.; G, M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. **Tropical Medicine & International Health.** 2020. 25(5):540-557. doi: 10.1111/tmi.13382.
- Verçosa BL, et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Vet Res** 2008; 4: 45. doi: 10.1186 / 1746-6148-4-45.
- Vrabelova D. et al. Analysis of 2735 canine uroliths in Spain and Portugal. A retrospective study: 2004-2006. **Res Vet Sci.** 2011 Oct;91(2):208-11. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.12.006.
- Waki, M. F. et al. Classification into stages of chronic kidney disease in dogs and cats: clinical, laboratorial and therapeutic approach. *Ciência Rural*, v. 40, n. 10, p. 2226–2234, 22 out. 2010. doi: 10.1590/S0103-84782010005000168.
- Weese J. S, et al. International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary tract infections in dogs and cats. **Vet J.** 2019 May;247:8-25. doi: 10.1016/j.tvjl.2019.02.008.
- Werner, P. R. Acúmulos ou deposições de substâncias. In: \_\_\_\_\_. *Patologia Geral Veterinária Aplicada*. São Paulo: Roca, 2011. P. 103-144.
- WHO. **Leishmaniose**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 8 out. 2022.
- World Health Organization (WHO). **Control of the leishmaniasis report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis**. Geneva, 2010. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf).
- World Health Organization (WHO). **Leishmaniasis - Epidemiological situation**. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

Yasur-Landau D. et al. Induction of allopurinol resistance in *Leishmania infantum* isolated from dogs. **PLoS Negl Trop Dis.** 2017 Sep 11;11(9):e0005910. doi: 10.1371/journal.pntd.0005910.

Zatelli A. et al. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. **Am J Vet Res.** 2003 May;64(5):558-61. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.558.

## 7. ANEXO

Vaccine: X 4 (2020) 100048



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine: X

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

## Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in *L. infantum*-infected dogs



Leopoldo F.M. Nascimento<sup>a</sup>, Dayane Francisca Higino Miranda<sup>a</sup>, Luana D. Moura<sup>a</sup>, Flaviane A. Pinho<sup>b</sup>, Guilherme Loureiro Werneck<sup>c</sup>, Ricardo Khouri<sup>d,e</sup>, Steven G. Reed<sup>f,g</sup>, Malcolm S. Duthie<sup>f,g</sup>, Aldina Barral<sup>d,e,h</sup>, Manoel Barral-Netto<sup>d,e,h</sup>, Maria S.P. Cruz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Piauí, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Teresina, PI, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Salvador, BA, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Estudos em Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>d</sup> Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, BA, Brazil

<sup>e</sup> Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Salvador, BA, Brazil

<sup>f</sup> Infectious Diseases Research Institute, Seattle, WA 98102, USA

<sup>g</sup> HDT Biotech Corporation, Seattle, WA 98102, USA

<sup>h</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Instituto de Investigação em Imunologia, São Paulo, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 June 2019

Received in revised form 1 November 2019

Accepted 9 November 2019

Available online 20 November 2019

#### Keywords:

Canine visceral leishmaniasis

Vaccine

Parasite

Drug

Clinical signs

### ABSTRACT

There is little evidence that current control strategies for canine leishmaniasis (CanL), the veterinary disease caused by *L. infantum* infection, are having a positive impact. This is of critical importance because dogs are a primary reservoir for *L. infantum* and a significant source of parasite transmission to humans. Drugs intended primarily for human use are prohibited for the treatment of CanL because of concerns over the propagation of resistant parasites. Although allopurinol effectively decreases parasite burden in CanL the treatment needs to be maintained for life. We hypothesized that during the allopurinol-induced parasite reduction dogs may become capable of developing a more robust immune response that may permit more effective control of parasites. To test this, we investigated the clinical and parasitological impact of short-term treatment with allopurinol, either alone or in combination with a defined sub-unit vaccine, on dogs naturally infected with *L. infantum*. A total of 28 dogs were distributed as follows: untreated; oral allopurinol alone (20 mg/kg, once each day for 90 days); or allopurinol with immunization with the Leish-F2 antigen formulated with the Toll-like receptor (TLR) 4 agonist Second generation Lipid Adjuvant (SLA) in stable emulsion (SE; SLA-SE). Dogs that did not receive treatment had a progressive decline in their clinical condition and an increase in their infection levels, while treatment with allopurinol alone alleviated the clinical symptoms of CanL but did not generate sustained reduction in parasites. Concomitant immunization with Leish-F2 + SLA-SE, however, improved clinical condition while also providing long-term clearance of *L. infantum* from lymphoid tissues and systemic organs. These results have important implications for both the management of CanL and for limiting *L. infantum* transmission to humans.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Observação: artigo em anexo no e-mail.