



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

CAROLINE DE JESUS SOUSA

DETECCÃO DE METALOPTIDASES TIPO GP63 EM *Leishmania infantum*
RECUPERADAS DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS

TERESINA - PI

2024

CAROLINE DE JESUS SOUSA

**DETECÇÃO DE METALOPEPTIDASES TIPO GP63 EM *Leishmania infantum*
RECUPERADAS DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas Animais de Interesse Regional da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção de Mestre em Ciências.

Orientação: Prof^o. Dr. André Luis Souza dos Santos
Coorientadora: Prof^a. Dra. Ivete Lopes de Mendonça

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Divisão de Representação da Informação

S725d Sousa, Caroline de Jesus.
 Detecção de metalopeptidases tipo gp63 em *Leishmania infantum*
recuperadas de gatos naturalmente infectados / Caroline de Jesus
Sousa. – 2024.
 105 f.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí,
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais
de Interesse Regional, 2024.

 “Orientação: Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos”.

 “Coorientadora: Prof^a. Dra. Ivete Lopes de Mendonça”.

 1. Leishmaniose Visceral. 2. Felinos. 3. Leishmanolisina.
4. Peptidase. I. Santos, André Luis Souza dos. II. Mendonça, Ivete
Lopes de. III. Título.

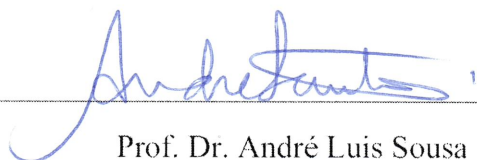
CDD 636.089 6

Bibliotecária: Francisca das Chagas Dias Leite – CRB3/1004

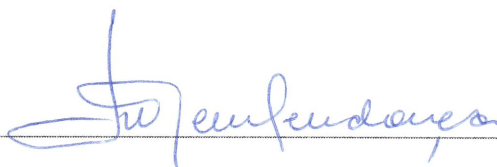
**DETECÇÃO DE METALOPEPTIDASES TIPO GP63 EM *Leishmania infantum*
RECUPERADAS DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS**

Caroline de Jesus Sousa

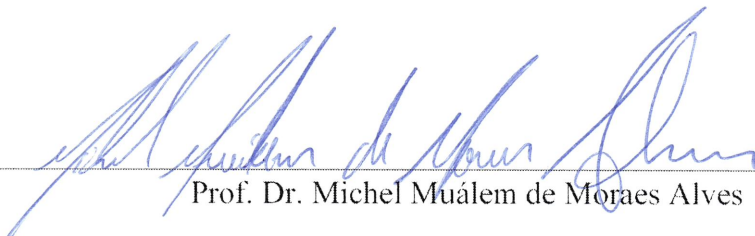
Banca examinadora:



Prof. Dr. André Luis Sousa Santos
(Presidente / Orientador) IMPG/UFRJ



Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça
(Examinadora interna/co-orientadora) DCCV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves
(Examinador interno) DMV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Rayssa Maria de Araújo Carvalho
(Examinadora externa) UNIFACID

Dedico às mulheres mais corajosas e dedicadas que conheci: minhas mães, Teresinha e Bete; minha irmã Juliana; e minhas sobrinhas Giovanna, Ana Luísa, Maria e Ana Carolina. À minha querida irmã Márcia Fernanda (*in memoriam*), que fez tanto por mim ao longo de sua vida. Às minhas maiores incentivadoras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por me fortalecer, capacitar e colocar pessoas maravilhosas para me ajudar em minha jornada no mestrado.

À minha querida família, pilar fundamental em minha vida, pela inabalável compreensão, amor e apoio. Aos meus amigos, verdadeiros tesouros da minha vida, por estarem ao meu lado nos momentos alegres e desafiadores.

Ao meu amado noivo Thiago, por ser meu porto seguro, companheiro e fonte de força. Sua presença trouxe equilíbrio e alegria aos meus dias. Suas risadas, conselhos e companhia tornaram esta jornada mais leve.

Ao meu orientador, André, expressei minha profunda gratidão pela orientação sábia, paciência, apoio incansável ao longo desta jornada acadêmica, seu acolhimento e a crença em meu potencial. Não foi apenas orientador, mas uma figura paterna e amiga, que tornou esta experiência ainda mais significativa. Minha inspiração tanto profissional como ser humano.

À minha coorientadora Ivete, pela valiosa colaboração que enriqueceram significativamente este estudo. Sua colaboração e orientação foram essenciais para o sucesso desta pesquisa.

À Professora Socorro, minha gratidão por me acolher no NUPCELT. Agradeço a sua compreensão e por assegurar que nada faltasse para o desenvolvimento da minha pesquisa, são gestos que não passam despercebidos. Sua orientação valiosa e apoio constante foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos amigos de laboratório: Ana Laura, Raniere, Marlene, Amanda, Nathalia, Wanderson, Simone e Joilson. Desde o início desta jornada, eles têm sido pilares essenciais, guiando-me com dedicação e paciência nos protocolos laboratoriais, desde os mais simples até os mais complexos. A colaboração e apoio deles foram fundamentais para o meu crescimento profissional e para o sucesso alcançado. Agradeço sinceramente por compartilharem seus conhecimentos e experiências.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

À Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional pela oportunidade da realização do curso.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta dissertação, meu sincero agradecimento.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Os gatos têm surgido como potenciais reservatórios de diferentes espécies de *Leishmania*, apesar de anteriormente serem considerados refratários à infecção. A maioria dos gatos infectados permanece saudável, possivelmente devido à sua resistência natural. A molécula gp63 é considerada um fator de virulência encontrada na superfície de promastigotas de todas as espécies de *Leishmania*. A gp63 é uma metalopeptidase de 63 kDa, que facilita a internalização do parasito em macrófagos, bem como sua nutrição, crescimento, diferenciação e escape do sistema imune. O objetivo do presente estudo foi investigar a presença de metalopeptidases, com ênfase na gp63, em promastigotas de *Leishmania infantum* isoladas de gatos naturalmente infectados na cidade de Teresina, Piauí. Extratos celulares de promastigotas foram obtidos através da lise com Triton X-100 a 0,1% e subsequentemente usados para detectar a metalopeptidase gp63. O sobrenadante de cultivo livre de células foi concentrado em um sistema Centricon, utilizando uma membrana de 10 kDa. A atividade proteolítica dos extratos celulares e sobrenadantes de *L. infantum* foi avaliada utilizando o substrato peptídico fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC a pH 10 por 60 minutos. No extrato celular, as cepas demonstraram uma atividade enzimática variando entre 2.600 e 100 Unidades Arbitrárias de Fluorescência (UAF). Já no sobrenadante, a atividade enzimática mensurada encontrou-se na faixa entre 800 e 100 UAF. Além disso, a presença de 1,10-fenantrolina (um inibidor clássico de metalopeptidases) inibiu a atividade dessas enzimas, sugerindo que se tratavam de metalopeptidases. Realizamos ensaios zimográficos para evidenciar a atividade enzimática da gp63, utilizando SDS-PAGE com gelatina incorporada como substrato. Após eletroforese, os géis foram incubados em tampão pH 10,0 e pH 5,0 por 48 horas a 37°C, com ou sem 10 mM de 1,10-fenantrolina. No extrato celular e no sobrenadante, foi observada uma degradação proteolítica em torno de 63 kDa, correspondente à enzima gp63, previamente identificada e caracterizada em diversas espécies de *Leishmania*, com um pH ótimo de 5,0. A atividade enzimática no extrato celular foi completamente inibida na presença de 1,10-fenantrolina indicando, novamente, a natureza metalopeptidásica da enzima. Por outro lado, no sobrenadante, não foram detectadas atividades enzimáticas, provavelmente devido a quantidade reduzida desta enzima. A detecção de gp63 foi também realizada através de Western blotting usando o anticorpo anti-gp63, tanto no extrato celular quanto no sobrenadante. No extrato celular, foram observadas bandas com massas moleculares variando entre 45 a 100 kDa. Enquanto isso, no sobrenadante, as cepas apresentaram um perfil reativo com bandas entre 63 kDa e 120 kDa. Na análise por citometria de fluxo, promastigotas foram fixadas com paraformaldeído e incubadas com o anticorpo primário anti-gp63, seguido por incubação com anticorpo secundário conjugado a fluoresceína, para quantificar a expressão de gp63 nos diferentes isolados. A análise foi realizada tanto para a detecção da gp63 localizada na superfície celular quanto no interior da célula. Observou-se que o percentual de células marcadas variou de 51% a 96% na superfície celular e de 46% a 95% no interior das promastigotas. Além disso, foi notada uma maior intensidade de fluorescência no interior celular entre 8000 a 2000 MIF, em comparação com a superfície celular que variou de 6000 a 2500 MIF. Em conclusão, nossos resultados indicam a presença de metalopeptidases com domínios homólogos à gp63 em promastigotas de *L. infantum* isolados de gatos. Essa descoberta aponta para potenciais implicações na virulência e na resposta imunológica do hospedeiro, destacando a importância deste estudo para uma compreensão mais aprofundada da leishmaniose em felinos.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral; Felinos; Peptidase, Leishmanolisina

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Cats have emerged as potential reservoirs of different species of *Leishmania*, despite previously being considered refractory to infection. Most infected cats remain healthy, possibly due to their natural resistance. The molecule gp63 is considered a virulence factor found on the surface of promastigotes of all *Leishmania* species. Gp63 is a 63 kDa metallopeptidase that facilitates the parasite internalization into macrophages, as well as its nutrition, growth, differentiation and evasion of the immune system. The aim of this study was to investigate the presence of metallopeptidases, with emphasis on gp63, in promastigotes of *Leishmania infantum* isolated from naturally infected cats in the city of Teresina, Piauí. Cellular extracts of promastigotes were obtained by lysis with 0.1% Triton X-100 and subsequently used to detect the metallopeptidase gp63. The cell-free culture supernatant was concentrated using a Centricon system with a 10 kDa cut-off membrane. The proteolytic activity of *L. infantum* cellular extracts and supernatants was evaluated using the fluorogenic peptide substrate Z-Phe-Arg-AMC at pH 10 for 60 minutes. In the cellular extract, the parasite strains demonstrated enzymatic activity ranging between 2,600 and 100 Arbitrary Fluorescence Units (AFU). In the supernatant, enzymatic activity ranged from 800 to 100 AFU. Additionally, the presence of 1,10-phenanthroline (a classic metallopeptidase inhibitor) blocked the activity of these enzymes, suggesting they were metallopeptidases. We conducted zymographic assays to demonstrate the enzymatic activity of gp63, using SDS-PAGE with gelatin incorporated as the substrate. After electrophoresis, the gels were incubated in buffer at pH 10.0 and pH 5.0 for 48 hours at 37°C, with or without 10 mM 1,10-phenanthroline. Proteolytic degradation around 63 kDa, corresponding to the gp63 enzyme previously identified and characterized in various *Leishmania* species, was observed in the cellular extract and supernatant, with an optimal pH of 5.0. Enzymatic activity in the cellular extract was completely inhibited in the presence of 1,10-phenanthroline, indicating again the metallopeptidase nature of this enzyme. However, no enzymatic activities were detected in the supernatant, likely due to the reduced amount of this enzyme. The detection of gp63 was also performed by Western blotting using anti-gp63 antibody, both in the cellular extract and supernatant. In the cellular extract, bands with molecular masses ranging from 45 to 100 kDa were observed, while in the supernatant, strains exhibited a reactive profile with bands between 63 and 120 kDa. Flow cytometry analysis was conducted, where promastigotes were fixed with paraformaldehyde and incubated with primary anti-gp63 antibody, followed by incubation with fluorescein-conjugated secondary antibody, to quantify gp63 expression in different isolates. The analysis was performed for both surface and intracellular gp63 detection. It was observed that the percentage of labeled cells ranged from 51 to 96% on the cell surface and from 46 to 95% inside the promastigotes. Additionally, a higher fluorescence intensity was noted inside the cell ranging from 8000 to 2000 MFI, compared to the cell surface which ranged from 6000 to 2500 MFI. In conclusion, our results indicate the presence of metallopeptidases with domains homologous to gp63 in *L. infantum* promastigotes isolated from cats. This discovery points to potential implications in host virulence and immune response, highlighting the importance of this study for a deeper understanding of leishmaniasis in felines.

Keywords: Visceral Leishmaniasis; Felines; Peptidase; Leishmanolysin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do ciclo biológico e de transmissão da <i>Leishmania</i>	16
Figura 2. Nódulos e lesões cutâneas em gatos infectados por <i>L. infantum</i>	23
Figura 3. Fatores de virulência da <i>Leishmania</i>	26
Figura 4. Esquema representativo da estrutura da molécula GP63	27
Figura 5. Fluxograma do Delineamento Experimental	33
Figura 6. Análise da Variação Temporal da Atividade Enzimática de Peptidase Presentes em Cepas de <i>L. infantum</i> :	38
Figura 7. Análise de Metalopeptidases Inibidas por 1,10-Fenantrolina (inibidor clássico de metalopeptidases) em Promastigotas de <i>L. infantum</i>	39
Figura 8. Identificação de Peptidases no Extrato Celular de <i>L. infantum</i>	40
Figura 9. Identificação de Peptidases no Sobrenadante de <i>L. infantum</i>	41
Figura 10. Western blot	42
Figura 11. Análise de Citometria de fluxo em promastigotas de <i>L. infantum</i>	43

LISTA DE ABREVIACOES

ADAMS= metaloproteases desintegrinas

AMC= 7-amino-4- metilcumarina

ANOVA= Análise De Variância

B.O.D.= Demanda de Oxignio Bioquímico

BSA= Albumina de soro bovino

CPs= Cisteína peptidases

DNA= cido Desoxirribonucleico

DTT= Ditionitrito

ECL= Electroquimiolumiscncia

ELISA= Ensaio De Imunoabsorção Enzimática

F= Fêmea

LF = Leishmaniose Felina

FeLV = Vírus da Leucemia Felina

FIG= Figura

FITC = isotiocianato de fluoresceína

FIV = Virus da Imunodeficiência Felina

FNT= Fenantrolina

FSC= Dispersão Frontal

GIPLs = Glicosilinositol-Fosfolipídios

GP63= Leishmanolisina Ou Metalopeptidase De Zinco

GPI = Glicosilfosfatidilinositol

IFAT= Teste de anticorpo fluorescente indireto

IFN- γ = Interferon-gama

IgG= Imunoglobulina G

IgM= Imunoglobulina M

LASAN= Laboratório de Doenças Infecciosas, Parasitárias, Microbiologia e Reprodução

LC = Leishmaniose cutânea

LEAMER= Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes

LPG = Lipofosfoglicano

LTA= Leishmaniose Tegumentar Americana

LV= Leishmaniose visceral

LVC= Leishmaniose Visceral Canina

M= Macho

MEC = componentes da matriz extracelular

MIF= Média de Intensidade de Fluorescência

MMPs= metaloproteinases

NP = Não permeabilizadas

OMS = Organização mundial da Saúde

OPAS= Organização Pan-Americana da Saúde

P= Permeabilizadas

PBS= Tampão Fosfato-Salino

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-RFLP = Reação Em Cadeia Da Polimerase E Polimorfismo De Fragmento De Restrição

pH= Potencial se Hidrogênio

PMs= Peso Molecular

PPGs= Proteofosfoglicanos

RIFI= reação de imunofluorescência indireta

SAPs= Fosfatase Ácida Secretada

SDS-PAGE = Gel de Eletroforese de Poliacrilamida com Dodecil-sulfato de sódio

SFB = Soro Fetal Bovino

SRD= Sem raça definida

SSC= Dispersão Lateral

Th1= Células T Helper 1

Th2= Células T Helper 2

TIMP= Inibição tecidual da metaloproteinase

UAF= Unidades Arbitrárias De Fluorescência

Z-Phe-ArgAMC = Carbobenzoxy-fenilalanil-arginina-7-amino-4-metilcumarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 TAXONOMIA E HISTÓRICO DO PROTOZOÁRIO <i>LEISHMANIA</i>	14
1.2 O CICLO DE VIDA DE <i>LEISHMANIA SPP.</i>	15
1.3 EPIDEMIOLOGIA, SOROPREVALÊNCIA E SAÚDE PÚBLICA.....	17
1.4 LEISHMANIOSE FELINA.....	19
1.5 SINAIS CLÍNICOS	21
1.6 PRINCIPAIS MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA INTERAÇÃO PARASITO-CÉLULA HOSPEDEIRA	24
1.7 GP63.....	26
1.7.1 BIOQUÍMICA DA GP63	26
1.7.2 FUNÇÕES.....	28
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 GERAL:	32
3.2 ESPECÍFICOS:	32
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> E CONDIÇÕES DE CULTIVO	34
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO CELULAR E DO SOBRENADANTE CONDICIONADO DE CULTIVO	34
4.3 DOSAGEM ENZIMÁTICA DA ATIVIDADE PEPTIDÁSICA	35
4.4 ANÁLISE DAS PEPTIDASES POR ELETROFORESE EM GEL	35
4.5 WESTERN BLOTTING	36
4.6 LOCALIZAÇÃO DA GP63 POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	36
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5 RESULTADOS	38
5.1 DETECÇÃO DE ATIVIDADE PEPTIDÁSICA USANDO SUBSTRATO FLUOROGÊNICO.....	38
5.2 ANÁLISE ZIMOGRÁFICA	39
5.3 WESTERN BLOTTING	41
5.4 CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE GP63 INTRACELULAR E DE SUPERFÍCIE CELULAR.....	42
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES.....	48
8 REFERÊNCIAS	49
ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Taxonomia e Histórico do protozoário *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) são parasitos intracelulares causadores das leishmanioses, um grupo de doenças negligenciadas (Vasconcelos *et al.*, 2018), esses parasitas afetam humanos e várias outras espécies de mamíferos, tanto domésticos quanto selvagens, apresentando diversas manifestações clínicas. (OMS, 2023). Os parasitos são transmitidos pela picada de fêmeas infectadas de dípteros flebotomíneos, que estão amplamente distribuídos geograficamente, abrangendo áreas de floresta, rurais, periurbanas e urbanas. (Neves, 2016). Aproximadamente 546 espécies de flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) já foram registradas nas Américas, estes vetores são popularmente conhecidos como mosquito palha, e estão divididos em sete gêneros: *Phlebotomus*, Rondani, 1840; *Sergentomyia*, França, 1924; *Chinius*, Leng, 1987; *Brumptomyia*, França e Parrot, 1921; *Lutzomyia*, França, 1924; *Warileya*, Hertig, 1948 e *Edentomyia*, Galati, 2003 (Sousa *et al.*, 2021). Esses vetores possuem uma alimentação generalista, podendo fazer repasto sanguíneo a partir de animais silvestres e domésticos, como os cães e gatos (Brasil, 2014; Brianti *et al.*, 2017; Maroli *et al.*, 2013).

Atualmente, nas Américas, 12 espécies de *Leishmania* são descritas como agentes etiológicos da doença em humanos e oito espécies como causadoras da doença em animais. Dessas, sete espécies foram identificadas no Brasil, pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*: *L. (L.) amazonenses*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* (Brasil, 2017).

A infecção natural por *Leishmania* já foi relatada em diferentes ordens de mamíferos, como Marsupialia, Xenarthra, Rodentia, Carnivora, Primata e Chiroptera (Machado; Silva; Vilani, 2016; WHO, 2010). Os cães, principalmente infectados por *L. infantum*, são considerados como os principais reservatórios do protozoário para os humanos que vivem em áreas endêmicas; outras espécies de animais silvestres e domésticos têm sido implicadas na epidemiologia da infecção como reservatórios secundários. Nesse contexto, os gatos, animais domésticos e sinantrópicos, surgiram como novos potenciais reservatórios da doença, sendo naturalmente infectados pela mesma espécie de *Leishmania* que afeta os cães e humanos em áreas tropicais e subtropicais no mundo todo (Batista *et al.*, 2023; Dantas-Torres; Brandão-Filho, 2006; Gramiccia, 2011; Otranto; Dantas-Torres, 2013; Pennisi, 2015).

Dentre os fatores que potencializam a ocorrência de zoonoses como as leishmanioses, destacam-se as mudanças ambientais, especialmente o desmatamento que resulta em alterações das condições naturais dos habitats de vetores e hospedeiros silvestres, promovendo a interação destes nos ambientes peridomiciliares. Essas áreas peridomiciliares apresentam condições com características sombreadas e úmidas, abrigos de animais domésticos e árvores frutíferas, que favorecem o desenvolvimento dos flebotomíneos e a interação destes com os hospedeiros e reservatórios, visto que, a disponibilidade de criadouros, abrigos e fontes alimentares permitem o estabelecimento do ciclo de transmissão da doença no peridomicílio (Brasil, 2014; Dos Reis *et al.*, 2017; Ferreira; Moraes, 2001; Machado; Silva; Vilani, 2016; WHO, 2010)

Outro fator que potencializa a ocorrência da leishmaniose é o não tratamento, ou tratamento incompleto do animal. É comum os donos dos animais infectados por leishmaniose abandonarem o tratamento, devido desanimarem com a terapia prolongada e a cura clínica e parasitológica incompleta e, portanto, tendem a abandonar o tratamento. Conseqüentemente, as recaídas são constantes quando o tratamento é suspenso resultando na persistência do parasito no hospedeiro, tornando-o uma fonte contínua de infecção (Baneth & Shaw, 2002).

1.2 O ciclo de vida de *Leishmania* spp.

A principal via de transmissão do parasito ao hospedeiro vertebrado acontece quando o parasito do gênero *Leishmania* é introduzido na forma de promastigotas metacíclicas por meio da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, durante o repasto sanguíneo em hospedeiros da classe Mammalia suscetíveis à infecção. As promastigotas são internalizadas por macrófagos teciduais, onde se transformam em amastigotas. Este estágio se reproduz por divisão binária até que a célula hospedeira esteja saturada de parasitos, resultando em sua ruptura. Com a destruição da célula hospedeira, numerosas amastigotas são liberadas e posteriormente fagocitadas por outros macrófagos, permitindo a continuidade do ciclo de reprodução assexuada. Um flebotomíneo não infectado, ao se alimentar do sangue de um hospedeiro vertebrado previamente infectado, ingere macrófagos contendo amastigotas e/ou amastigotas livres. Ao passar pelo trato digestório do hospedeiro invertebrado, os macrófagos se rompem, liberando as amastigotas. No intestino do inseto, forma-se uma rede fibrosa composta de quitina e várias proteínas associadas à membrana peritrófica, onde ocorre a diferenciação de amastigotas para promastigotas procíclicas (Pimenta *et al.*, 1997; Sacks, 2001; Soares *et al.*, 2005). As formas promastigotas procíclicas se multiplicam vigorosamente, dando origem às nectomonas, formas mais alongadas que preenchem o intestino abdominal anterior. Após 60-

72 horas, ocorre a evasão da membrana peritrófica e a adesão às microvilosidades das células epiteliais da porção anterior do intestino médio (Walters et al., 1992). De 4 a 7 dias após a infecção, todo o conteúdo alimentar é eliminado, e os promastigotas nectomonas se diferenciam em promastigotas leptomonas, resultando em uma infecção maciça do intestino médio anterior. As leptomonas, por sua vez, diferenciam-se em promastigotas metacíclicas. Esse processo de transformação para a forma promastigota metacíclica é conhecido como metaciclogênese (Kamhawi, 2006).

Os promastigotas metacíclicos, sendo a forma infectante, são pequenos e delgados, com flagelos longos e altamente móveis, não apresentando capacidade de multiplicação (Saraiva et al., 2005). Durante esse estágio de desenvolvimento, também são observadas formas curtas e largas denominadas haptomonas, além de formas de pequeno corpo classificadas como paramastigotas. Os promastigotas metacíclicos migram então para o esôfago e faringe, alojando-se na probóscide do vetor e bloqueando a entrada de sangue durante um novo repasto sanguíneo. Contrações musculares na probóscide levam o flebotomíneo a regurgitar o sangue recém-ingerido, contendo os promastigotas metacíclicos (Kamhawi, 2006) (Figura 1).

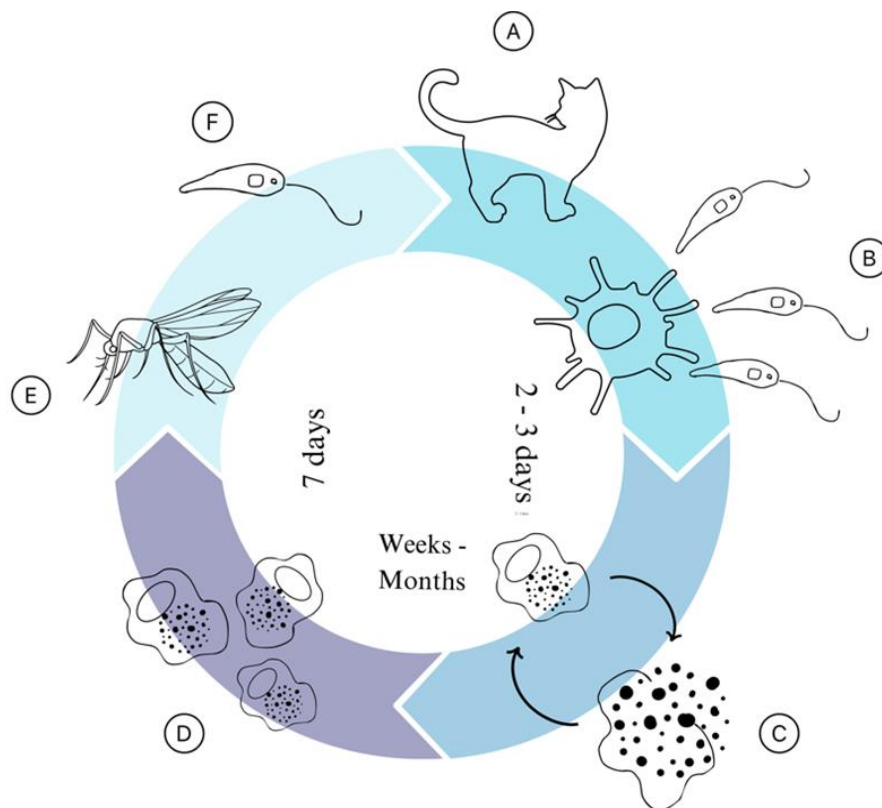


Figura 1. Representação do ciclo biológico e de transmissão da *Leishmania*. (A) Hospedeiro vertebrado infectado com promastigotas metacíclicas após o repasto sanguíneo. (B) Promastigotas metacíclicas infectam macrófagos, (C) diferenciam-se em amastigotas, proliferam e rompem a célula hospedeira (D), disseminando o parasito e atraindo outros macrófagos que se tornam infectadas. (E) Flebotomíneo fêmea, ao se alimentar, ingere formas amastigotas

presentes no sangue (F), que se diferenciam em promastigotas em seu trato digestivo, migram para a probóscida e reiniciam o ciclo após uma refeição de sangue. FONTE: Elaboração própria.

1.3 Epidemiologia, Soroprevalência e Saúde Pública

Em 2018, a leishmaniose cutânea (LC) era considerada endêmica em 92 países ou territórios, enquanto a leishmaniose visceral (LV) tinha registros em 83 nações. Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas residem em áreas propensas à leishmaniose, expondo-se ao risco de infecção. Estima-se que a cada ano ocorram mais de 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LC. Em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recebeu notificações de casos de LV, com destaque para Sudão, Brasil, Quênia e Sudão do Sul, que registraram 4347, 1684, 1573 e 1058 casos notificados, respectivamente. No mesmo ano, o Egito se destacou nas notificações de LC, totalizando 200 casos (WHO, 2024).

Nas regiões endêmicas, a distribuição da doença se dá de modo difuso, tendo pequenos focos de transmissão com distribuição baseada nas condições ecológicas que refletem no comportamento dos vetores, parasitos e reservatórios (Dantas-Torres, 2007). Missawa, Lorosa e Dias (2008) relataram que a proximidade do homem com áreas florestais e a criação de animais domésticos, atraem uma quantidade elevada de flebótomos próximos aos domicílios, ocorrendo grandes chances de infecção por *Leishmania* (Godoi *et al.*, 2016).

Na América Latina, 90% dos casos registrados de leishmaniose ocorrem no Brasil. Em média, anualmente são registrados aproximadamente 3.500 casos, com um coeficiente de incidência de 2,0 casos por 100.000 habitantes. Nos últimos anos, observou-se um aumento progressivo na letalidade, que passou de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012. Em 2022, dos 1684 casos registrados de LV, 731 ocorreram no estado do Nordeste, seguidos de 237 no Norte, 245 no Sudeste, 105 no Centro- Oeste e 6 no Sul, sendo a região Nordeste considerada a principal zona endêmica da LV nas Américas (OMS, 2023).

A alta prevalência da doença observada nas áreas urbanas pode ser atribuída à elevada densidade populacional, ao aumento das migrações, as alterações ambientais, as condições de vida da população inadequada e a adaptação do vetor ao meio urbano (OMS, 2023; Rodrigues *et al.*, 2017).

Entre os 9 países que relatam 85% dos casos de LC três deles estão localizados nas Américas: Brasil, Colômbia e Peru. Na Região das Américas, foram notificados casos de LC do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção das ilhas do Caribe e do Chile. No período de 2001 a 2021, um total de 1.105.545 casos de LC e mucosa foram notificados à OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). No Brasil, esta é considerada uma das afecções

dermatológicas de grande magnitude e com elevado risco de ocorrência de deformidades (Pan American Health Organization, 2019).

A LV é endêmica em 78 países (Ruiz-Postigo JA et al., 2020). Embora a incidência tenha diminuído nos últimos anos, em 2018 foram notificados aproximadamente 17.000 novos casos, sendo 90% deles registrados no Brasil, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia, Quênia, Somália e Índia (Ruiz-Postigo JA et al., 2020). Além disso, infecções também têm sido registradas no sul da Europa. Um estudo realizado com viajantes na Europa entre 2000 e 2012 identificou 10 casos de LV e 30 casos de LC, com locais de exposição destacados na Espanha, Malta e Itália (Ehehalt et al., 2014).

No Brasil, no contexto epidemiológico, a leishmaniose visceral canina (LVC) é considerada relevante, pois a doença canina é mais prevalente no território nacional e, dentro de uma mesma área, precede a ocorrência dos casos humanos (Rodrigues *et al.*, 2017). A presença de casos humanos e caninos assim como de flebotômíneos é um aspecto importante para a compreensão do ciclo de transmissão da LV (Rodrigues *et al.*, 2017). Os cães infectados são considerados os principais reservatórios do parasito, como animais domésticos, possuem relação direta com o ser humano. Os cães são suscetíveis ao protozoário e também são as principais fontes de infecção aos flebotômíneos (Ribeiro *et al.*, 2018). Além da infecção em cães, os gatos têm se tornado uma importante chave na cadeia epidemiológica da manutenção e transmissão de *Leishmania*, sendo considerado como uma espécie hospedeira acidental ou alternativa (Maia; Campino, 2011)

A LF causada por *L. infantum* foi identificada em três gatos em Teresina, Piauí, Brasil, uma área endêmica para LV. Esses três gatos infectados eram oriundos do mesmo bairro, onde a falta de saneamento básico era evidente (Mendonça *et al.*, 2017). O início da transmissão da doença na cidade remonta a 1981, impulsionado pelas condições de vida desfavoráveis da população e pelas alterações ambientais decorrentes do rápido processo de urbanização. Esses fatores contribuíram presumivelmente para a adaptação do vetor ao ambiente urbano (Costa; Pereira; Araújo, 1990).

A doença, antes limitada às áreas rurais e às pequenas localidades urbanas, encontra-se em franca expansão para grandes centros, em um processo de periurbanização e urbanização que vem ocorrendo nas últimas décadas. Tem se tornado um importante problema de saúde pública, onde fatores sociais, econômicos e ambientais estão interligados, entre eles a urbanização acelerada e o desmatamento, que facilitam a sua ocorrência (Brasil, 2017).

Diante disso, o principal desafio para o estabelecimento de ações de saúde pública efetivas quanto ao combate e controle das leishmanioses, diz respeito à compreensão da dinâmica ecológica envolvida nas zoonoses, sendo este conhecimento essencial para que o poder público consiga estabelecer medidas efetivas contra a infecção (Machado; Silva; Vilani, 2016).

Dentre os aspectos ecológicos da transmissão da infecção, a compreensão das características ambientais das áreas de manutenção do ciclo de vida do vetor, se constitui como o principal conhecimento necessário para reduzir o contato humano-vetor. Outra ferramenta essencial para redução deste problema de saúde pública, são as ações de educação em saúde, que devem ser incorporadas aos serviços na forma de ações e práticas visando a promoção da educação e a transformação de indivíduos e dos seus grupos, de modo a aumentar a compreensão destes acerca das problemáticas da área da saúde, de modo que este instrumento preventivo de intervenção utilizado pelo poder público seja capaz de orientar a população quanto às ações que resultam na redução dos casos de leishmanioses (Machado; Silva; Vilani, 2016; Brasil, 2019).

1.4 Leishmaniose Felina

O primeiro relato de infecção por *Leishmania* em gatos domésticos data de 1912 e até os anos 2010 acreditava-se que estes animais eram resistentes à infecção (Pennisi, 2015; Sergent *et al.*, 1912). Entretanto, estudos mais recentes registram a infecção de gatos por diferentes espécies de *Leishmania* (Nascimento *et al.*, 2022). De acordo com Pennisi *et al.* (2015), cinco espécies de *Leishmania* foram identificadas em gatos no Novo Mundo: *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* e *L. infantum* no Novo e Velho Mundo. No Brasil, as espécies *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. major* e *L. tropica* foram descritas infectando gatos (Paşa *et al.*, 2015; Pennisi, 2015).

A leishmaniose felina (FL) apesar de ser pouco comum no Brasil, apresenta registros de gatos infectados pelas mesmas espécies de *Leishmania* que acometem os cães e humanos das áreas endêmicas (Oliveira *et al.*, 2020). Considerando a endemicidade da infecção no país, vem sendo relatado o aumento da ocorrência dessa enfermidade em gatos no Brasil (Batista *et al.*, 2020; Noe *et al.*, 2015; Pirajá *et al.*, 2013). Somado a isso, o fato de os gatos serem considerados animais de companhia e, nas últimas décadas, os felinos estarem ocupando os espaços domiciliares anteriormente ocupados pelos cães, torna-se ainda mais relevante a busca pela elucidação do papel desses animais quanto a transmissão dessa doença (Asfaram; Fakhar;

Teshnizi, 2019; da Silva *et al.*, 2023; Da Silveira Neto *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2022; Pennisi, 2015; Pennisi; Persichetti, 2018).

Em áreas endêmicas para leishmaniose canina, é comum a presença de gatos soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania* (Pennisi, 2015). Assim, segundo Da Silva *et al.* (2023), a coabitação dos gatos com cães e flebotomíneos infectados podem favorecer à exposição dos gatos ao parasito. Noé *et al.* (2015) sugerem que os gatos domésticos podem atuar como elo entre ambientes silvestres e domésticos ao se deslocarem para áreas periurbanas e rurais, o que favorece a disseminação do parasito devido à maior exposição ao vetor.

O gato doméstico (*Felis catus*) pode se infectar com diferentes espécies de *Leishmania*, as mesmas espécies que afetam os cães e os humanos em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo (Pennisi; Persichetti, 2018; Pirajá *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2020). Segundo os resultados de Batista *et al.* (2020), os felinos possuem participação significativa no ciclo biológico de espécies de *Leishmania*, como *L. infantum*; são capazes de atuar como uma fonte alimentar para os flebotomíneos, e ainda, de atuarem como reservatório do patógeno, possibilitando a transmissão vetorial para o cão a até para os humanos. Além de serem capazes de manter a infecção ativa, estudos com xenodiagnóstico comprovam a capacidade dos felinos de infectar os flebotomos (Maia; Campino, 2011; Mendonça *et al.*, 2020).

Apesar de não possuírem uma total elucidação quanto ao seu papel no ciclo epidemiológico das leishmanioses, a literatura aponta que, pelo menos, sete espécies do gênero *Leishmania* já foram descritas em gatos, principalmente em machos adultos que vivem ou viajam para áreas endêmicas (Pereira; Maia, 2021).

A espécie *L. infantum* é a espécie mais prevalente, sendo assim considerada a principal responsável pelos casos de FL, sendo inicialmente registrada no Brasil em 2004, podendo o animal não apresentar qualquer sintomatologia ou apresentar os sinais clínicos da doença, que quando presentes são, geralmente, sinais cutâneos, lesões oculares, e síndrome gengivoestomatite crônica felina (da Silva *et al.*, 2023; Nascimento *et al.*, 2022; Savani *et al.*, 2004; Pennisi *et al.*, 2015; Asfaram; Fakhar; Teshnizi, 2019).

A patogênese das alterações viscerais da FL ainda não é completamente descrita, entretanto, Batista *et al.* (2023) relataram a ocorrência de hiperemia de baço, fígado e rins em gatos com leishmaniose.

Quanto à prevenção, a FeL ainda não é consensual, porém, sugere-se a adoção da aplicação de repelentes contra os vetores, assim como nos cães (Pennisi *et al.*, 2015). Brianti *et al.* (2017) afirmam que, coleiras impregnadas com a combinação de imidacloprida e flumetrina é segura e efetiva na redução do risco de infecção felina por *L. infantum*, sendo uma medida preventiva eficaz para LF, promovendo proteção individual dos animais, especialmente daqueles que vivem ou frequentam áreas endêmicas para *L. infantum*.

De acordo com Pennisi e Persichetti (2018), o tratamento para felinos infectados por *Leishmania* ainda não é consensual, sendo utilizado de forma empírica os mesmos fármacos empregados no tratamento da leishmaniose canina. De acordo com Mendonça (2019), até o presente momento, não existem comprovação de que os gatos sejam capazes de suportar a mesma terapêutica empregada nos cães, desta forma, os protocolos utilizados nos gatos não possuem eficácia e seguridade comprovadas, sendo necessário o acompanhamento e monitoramento destes animais quanto aos efeitos colaterais do tratamento.

A terapia baseada na administração via oral de alopurinol (9 mg/kg) como monoterapia ou em associação ao antimoniato de meglumina são os protocolos mais utilizados (Pennisi; Persichetti, 2018). Segundo Pereira e Maia (2021), a monoterapia do alopurinol tem resultado em melhorias no estado clínico dos pacientes, entretanto, produzindo também algumas reações adversas cutâneas e elevação das enzimas hepáticas, em alguns casos levando a lesão renal aguda. A vacinação contra a LF ainda não é prevista, uma vez que a vacina utilizada no Brasil contra a *L. infantum*, Leish-Tec[®] do laboratório Hertape Calier Saúde Animal, só pode ser utilizada em cães (Sousa, 2017).

1.5 Sinais Clínicos

Apesar do crescente aumento dos registros de casos de felinos infectados por *Leishmania*, muitos aspectos da doença nesses animais ainda não estão esclarecidos. Dentre os quais, as alterações clínicas e patológicas ainda são limitadas e até o presente, apenas algumas descrições pontuais dos sinais clínicos e das alterações fisiológicas são relatadas, entretanto, não apresentam padrões ou categorias de infecções (Pennisi *et al.*, 2015a; Pennisi; Persichetti, 2018).

A LF é comumente associada com infecções imunossupressoras, como as infecções retrovirais por FIV (Feline Immunodeficiency Virus) e por FeLV (Feline Leukemia Virus), os tratamentos imunossupressivos e doenças debilitantes concomitantes, como neoplasia ou

diabetes mellitus, estas associações acabam por prejudicar a resposta imune celular e podem permitir a multiplicação ativa do parasito e a sua disseminação visceral (Grevot *et al.*, 2005; Pennisi, 2015).

Em gatos, assim como ocorre nos cães, a doença pode não resultar no aparecimento de sinais clínicos específicos, dificultando o diagnóstico, pois a leishmaniose pode ser confundida com outras doenças, como por exemplo, a esporotricose – uma doença fúngica (Oliveira *et al.*, 2020). Os felinos oligossintomáticos apresentam manifestações clínicas comuns àquelas encontradas em outras patologias, sendo os sinais clínicos inespecíficos mais comuns o emagrecimento progressivo e o complexo gengivite-estomatite (Santos *et al.*, 2018).

Dentre os sinais inespecíficos destacam-se a desidratação, o corrimento ocular, estomatite ulcerativa, febre, anorexia, vômito, otite, linfadenopatia localizada, distensão abdominal e diarreia crônica (Godoi *et al.*, 2016). Além dessas, algumas manifestações clínicas esporádicas incluem a palidez de membranas mucosas, hepatomegalia, caquexia, febre, vômito, diarreia, esplenomegalia, poliúria/polidipsia, dispneia, sibilo, aborto e hipotermia (Pennisi *et al.*, 2015a).

Os gatos sintomáticos podem apresentar uma única manifestação clínica ou sinais clínicos inespecíficos, que comumente incluem lesões nodulares ou ulceradas no focinho, lábios, orelhas e pálpebras e alopecia, sem sofrer da doença (Santos *et al.*, 2018).

De acordo com Pennisi *et al.* (2015a), os principais sinais clínicos relatados na LF incluem lesões da pele ou mucocutâneas e linfonomegalias. Em alguns casos, os animais podem demonstrar apenas lesões dermatológicas isoladas, enquanto em outros, os animais podem se apresentar com lesões de pele associadas com sinais sistêmicos; já a linfonomegalia pode ser solitária ou multicêntrica. Segundo Da Silva *et al.* (2023), as lesões cutâneas e linfonomegalias são os sinais clínicos mais frequentes da LF, independente da espécie de *Leishmania* que esteja causando a infecção e, além disso, as áreas da cabeça, orelhas e nariz sejam as áreas mais afetadas devido a tendência dos flebotomíneos picarem áreas sem pelos.

Linfadenopatia, alterações oculares, renais, hepáticas e da cavidade oral são os achados não cutâneos mais frequentes, encontrados isoladamente ou em combinação com sinais cutâneos (Pirajá *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015; Noé *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2018).

As lesões cutâneas predominam na imagem clínica de LF em função da infecção por *L. infantum*. Dentre as anormalidades dérmicas estão incluídos os nódulos, ulcerações ou até dermatite esfoliativa, podendo ser generalizadas ou localizadas, simétricas ou assimétricas e até podendo aparecer em todo o corpo em uma região focal, multifocal ou em um padrão difuso. A presença de nódulos cutâneos e mucocutâneos, de tamanho variável, são normalmente encontrados na cabeça, incluindo áreas de pálpebras, focinho e lábios ou nas partes distais dos membros, podendo também serem encontrados na mucosa anal. Outras apresentações dermatológicas incomuns incluem pápulas hemorrágicas e nódulos que podem conter formas amastigotas do parasito (Pennisi *et al.*, 2015a). Pennisi *et al.* (2015) ainda descreveram a ocorrência de lesões oculares, sendo a uveíte (uni ou bilateral) a mais comum dentre elas e, lesões nodulares na mucosa gengival ou na língua. A figura 2 apresenta lesões dermatológicas de gatos infectados por *L. infantum*.

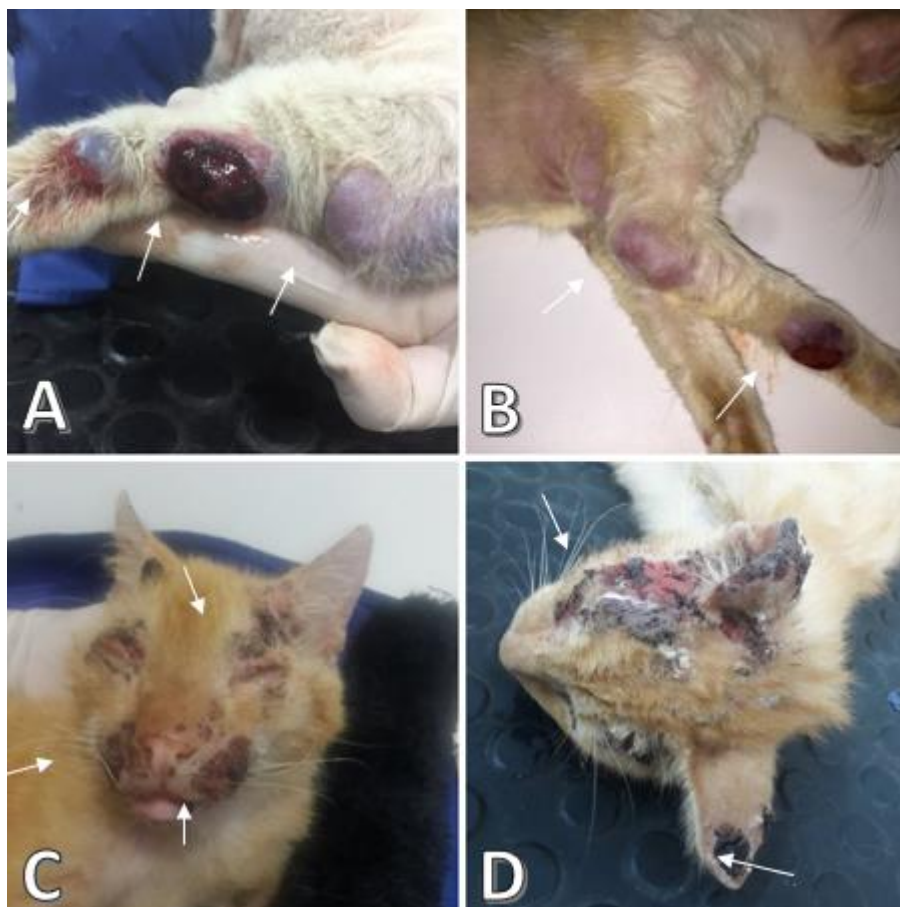


Figura 2. Nódulos e lesões cutâneas em gatos infectados por *L. infantum*. A e B, nódulos e lesões nas pernas. C e D, lesões envolvendo face e orelhas. Fonte: Batista (2019).

1.6 Principais moléculas envolvidas na interação parasito-célula hospedeira

Ao longo de seu ciclo de desenvolvimento, a *Leishmania* sofre diversas modificações tanto morfológicas quanto bioquímicas, abrangendo aspectos como o metabolismo energético, a degradação de proteínas, a motilidade, bem como as defesas antioxidantes e àquelas associadas ao estresse. Essas adaptações conferem ao parasito a habilidade de persistir, reproduzir-se dentro dos macrófagos e disseminar-se para estabelecer a infecção (Brandonisio *et al.*, 2000; Contreras *et al.*, 2010; Shio *et al.*, 2012).

Os elementos cruciais que influenciam o parasitismo e o nível de patogenicidade são predominantemente determinados por fatores moleculares específicos do parasito, frequentemente referidos como fatores de virulência, que na *Leishmania* estão inclusos proteínas e carboidratos. A intensidade da interação desses fatores é um determinante chave do grau de patogenicidade, que pode ser avaliado pelo nível de parasitemia e/ou pelo tamanho da lesão (Aoki *et al.*, 2019; Cardoso *et al.*, 2019; Qi; Popov; Soong, 2001).

Esses fatores capacitam o parasito a se pré-adaptar ao ambiente do hospedeiro mamífero, respondendo ao aumento de temperatura e à diminuição do pH dentro dos macrófagos. Essas adaptações são essenciais para o estabelecimento inicial no local da picada, facilitando a invasão de macrófagos e a proliferação nas condições extremas dos compartimentos fagolisossômicos. Além disso, esses fatores são empregados para evitar/evadir a resposta imunológica celular e humoral do hospedeiro (Al-Khalafah *et al.*, 2018).

Glicosilinositols (GIPLs), lipofosfoglicanos (LPGs), proteofosfoglicanos (PPGs) e a glicoproteína gp63 são as principais moléculas representativas desse grupo de fatores que contribuem para a patogênese e permitem ao parasito estabelecer a infecção (Franco; Beverley; Zamboni, 2012; Gupta; Oghumu; Satoskar, 2013).

Os LPGs (glicoconjugados de superfície) são moléculas cruciais na membrana do parasito *Leishmania*, fixadas por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Predominantemente presentes na forma promastigota, os LPGs sofrem uma redução significativa na forma amastigota. Com uma estrutura complexa, compreendendo âncora GPI, núcleo de glicano, fosfoglicano e capa oligossacarídica, sua variação estrutural depende da espécie e do estágio do ciclo de vida parasitária (Ferguson, 1999; Ilg *et al.*, 1992; Valente *et al.*, 2019). São os primeiros alvos imunológicos quando a forma metacíclica da *Leishmania* infecta um hospedeiro, agindo como barreiras à ligação de moléculas do complemento (Franco;

Beverley; Zamboni, 2012; Gupta; Oghumu; Satoskar, 2013). O GLP facilita a ligação e a fagocitose pelos macrófagos, promovendo a replicação e diferenciação parasitária (Anversa *et al.*, 2018). Associado a diversos mecanismos, como evasão da lise do complemento e sobrevivência em macrófagos, os LPGs desempenham um papel fundamental como fatores de virulência para a *Leishmania* (Franco; Beverley; Zamboni, 2012).

O entendimento sobre os efeitos provocados pelos GIPLs na virulência é limitado. É conhecido que essas moléculas estão presentes nas formas celulares promastigota e amastigota do parasito, e possuem a capacidade de inibir a síntese de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, contribuindo para a proteção do parasito contra danos (Franco; Beverley; Zamboni, 2012). Além disso, evidências indicam que os GIPLs interferem na via da proteína quinase C (PKC), promovendo a sobrevivência do parasito. Essa interação também está relacionada a outros fatores de virulência, como GLPs e gp63, embora cada um desses fatores empregue um mecanismo inibitório distinto (Gupta; Oghumu; Satoskar, 2013).

Os PPGs são glicoproteínas presentes nas formas promastigota e amastigota da *Leishmania*, com estrutura semelhante à mucina e aos GLPs. Além de estarem na superfície do parasito, os PPGs podem ser liberados pelos amastigotas no meio extracelular (Ilg, 2000; Živanović *et al.*, 2018). Eles desempenham papéis cruciais na interação com os macrófagos, facilitando a internalização do parasito e modulando a resposta do hospedeiro. Nos estágios iniciais da infecção, os PPGs podem inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, mas, quando os macrófagos são ativados, contribuem para a destruição do parasito através da produção de óxido nítrico (Piani *et al.*, 1999). Os PPGs também impactam a atividade proteolítica no soro e influenciam o sistema complemento (Peters *et al.*, 1997), sendo essenciais para a sobrevivência do amastigota nos macrófagos hospedeiros (Franco; Beverley; Zamboni, 2012).

A GP63, uma metalopeptidase de 63 kDa, desempenha um papel crucial na sobrevivência do parasito ao protegê-lo da ação lítica do sistema complemento. Ela atua inibindo a formação do complexo de ataque à membrana por meio da clivagem da cascata das convertases (Ma *et al.*, 2011).

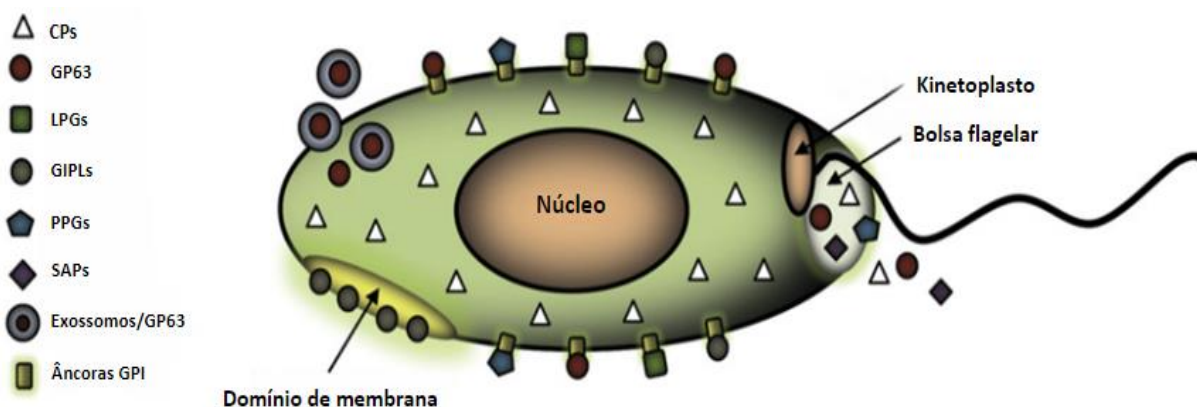


Figura 3. Fatores de virulência da *Leishmania*. Representação esquemática de um promastigota mostrando as moléculas de superfície GP63, LPGs, PPGs e GIPLs ancoradas em GPI, que estão principalmente associadas a microdomínios de membrana. Fonte: Adaptado de Olivier *et. al.* (2012).

Em *Leishmania* spp. e outros tripanossomatídeos, as peptidases desempenham um papel crucial na interação parasito-hospedeiro. Elas estão diretamente envolvidas na degradação do tecido conjuntivo durante a invasão, na ruptura das células do hospedeiro e na degradação de proteínas do citoesqueleto do hospedeiro. Além disso, as peptidases desempenham um papel central na evasão ou modulação do sistema imunológico, seja por meio da degradação ou ativação de moléculas do sistema imune, e são fundamentais na invasão das células hospedeiras. Além de sua importância na patogenicidade desses parasitas, as peptidases estão envolvidas em eventos essenciais do ciclo de vida desses microrganismos. Isso inclui a remodelação do parasita durante a transição entre estágios de vida, bem como a ativação ou degradação de enzimas ou proteínas regulatórias do parasita. Além disso, as peptidases são cruciais no processamento de proteínas para fins nutricionais. Essa interação complexa destaca o papel multifuncional das peptidases na biologia e patogenicidade desses parasitos (Sajid; McKerrow, 2002).

1.7 GP63

1.7.1 Bioquímica da GP63

A metalopeptidase dependente de zinco denominada glicoproteína 63 (GP63) ou leishmanolisina encontrada na superfície do parasito *Leishmania* foi descoberta pela primeira vez na década de 1980, sendo descrita genética e bioquimicamente como um importante antígeno de superfície expresso em promastigotas de *Leishmania* de várias espécies e possuindo

uma ampla gama de substratos incluindo caseína, gelatina, albumina, hemoglobina e fibrinogênio (Yao; Donelson; Wilson, 2003).

A gp63 liberada pode ter diferentes massas moleculares devido a seu grau de glicosilação (Ellis *et al.*, 2002). A liberação da gp63 ancorada à superfície do parasito via ancora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) é regulada por autoproteólise. A presença de um quelante de zinco ou mutação do motivo de ligação de zinco afeta a autoproteólise e, conseqüentemente, a sua secreção (McGwire *et al.*, 2002).

A atividade proteolítica da gp63 foi descoberta acidentalmente quando frações do parasito contendo esta proteína foram misturadas com padrões de massa molecular para SDS-PAGE (Gel de Eletroforese de Poliacrilamida com Dodecil-sulfato de sódio) (Bordier, 1987; Etges; Bouvier; Bordier, 1986). Além disso, corresponde a cerca de 1% do total de proteínas presentes nos promastigotas (Bouvier *et al.*, 1985) e pertence a classe enzimática EC 3.4.24.36 (clã MA, família M8 de endopeptidases) (d'Avila-Levy *et al.*, 2013; Yao, 2010; Yao *et al.*, 2003).

Do ponto de vista estrutural, a gp63 apresenta um sítio catalítico dependente de zinco, composto pelo *motif* HEXXH. A proteína é organizada em três regiões distintas: amino terminal (N-terminal), domínio central e carboxi-terminal (C-terminal) com cerca de 25 resíduos de aminoácidos (Figura 5).



Figura 4. Esquema representativo da estrutura da molécula GP63. Na representação visual, é possível identificar as diferentes regiões, destacadas em vermelho para a porção N-terminal, verde para o domínio central e azul para a porção C-terminal. As ligações de pontes dissulfeto são indicadas pela cor amarela, enquanto a esfera rosa simboliza a presença da molécula de zinco no sítio catalítico (Schlagenhauf; Etges; Metcalf, 1998).

Como já mencionado, a gp63 exibe uma ampla especificidade de substrato e possui um pH ótimo (Bouvier *et al.*, 1989; Chaudhuri; Chang, 1988; Schneider; Glaser, 1993), variável entre diferentes espécies de *Leishmania* (Tzinia; Soteriadou, 1991), podendo divergir conforme o substrato e o método de ensaio utilizados (Ilg; Harbecke; Overath, 1993). A gp63 é sintetizada no retículo endoplasmático, enquanto uma pequena parte é retida no RE, a maior parte é expressa na superfície do parasito, e o restante é liberado ou clivado da membrana (Ellis *et al.*, 2002; McGwire *et al.*, 2002; Weise *et al.*, 2000).

1.7.2 Funções

Diversos papéis adicionais têm sido propostos para a molécula gp63 quando o promastigota está dentro do hospedeiro mamífero, como será detalhado posteriormente. A gp63 desempenha papéis vitais nas diferentes etapas do ciclo de vida da *Leishmania*, onde várias espécies de contêm classes distintas de genes *gp63* que são regulados no desenvolvimento em diferentes estágios do ciclo de vida do parasito, incluindo os estágios amastigota, promastigota logarítmica e promastigota metacíclica (Medina-Acosta; Karess; Russell, 1993).

Estudos evidenciaram que a expressão de gp63 sofre modificações conforme a cepa de *Leishmania* e sua habilidade de interação com macrófagos, corroborando que a presença de peptidases é crucial para a virulência do gênero nos processos de nutrição, invasão celular, sobrevivência intracelular, diferenciação e proliferação (Lima *et al.*, 2009).

Esta enzima, classificada como endopeptidase, não apresenta atividade exopeptidase. Após a ativação da proteína precursora, que ocorre por meio de um processo envolvendo a mudança conformacional de uma cisteína, a gp63 pode hidrolisar uma variedade de substratos proteicos, incluindo proteínas séricas como albumina, caseína, componentes do complemento, fibrinogênio, hemoglobina e imunoglobulinas (Bouvier *et al.*, 1990), assim como componentes da matriz extracelular como colágeno tipo IV e fibronectina. Isso pode facilitar a migração do parasito através da membrana basal subendotelial, promovendo a disseminação nos tecidos (McGwire; Chang; Engman, 2003).

Corradin *et al.* (1999) relataram que a gp63 cliva o substrato C quinase rico em alanina miristoilado (MARCKS), uma das primeiras moléculas envolvidas na sinalização celular, quando eles notaram uma expressão anormal de proteínas relacionadas ao MARCKS (MRP) em macrófagos infectados por *L. major*. Verificou-se posteriormente que esta degradação de MRP estava ausente na presença de inibidores de gp63, bem como quando o local de clivagem

potencial gp63 do MRP foi mutado, confirmando assim que Ggp63 foi responsável pela hidrólise de MARCKS / MRP (Corradin *et al.*, 1999)

Devido à sua presença em ambas as formas do parasito, o GP63 provavelmente desempenha diferentes funções dependendo do estágio do parasito. Em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. major*, foi descoberto que o GP63 cliva o C3b em iC3b, auxiliando o parasito a evitar a lise mediada pelo complemento (Brittingham *et al.*, 1995). Ao mesmo tempo, a geração de iC3b pode atuar como uma opsonina, facilitando a interação do parasito com os macrófagos por meio dos receptores do complemento 1 e 3, favorecendo sua internalização (Mosser; Edelson, 1985). Também foi relatado que o GP63 interage com o receptor de fibronectina (FR), possivelmente contribuindo ainda mais para a adesão do parasito aos macrófagos (Brittingham *et al.*, 1999).

Outra descoberta importante é que, uma vez que os promastigotas de *L. mexicana* estão em contato com a matriz extracelular do tecido subcutâneo, o GP63 pode degradar os componentes extracelulares, favorecendo sua rápida migração em matrizel *in vitro* (McGwire; Chang; Engman, 2003). A GP63 também é capaz de clivar CD4 de superfície, podendo diminuir a resposta de células T (Hey *et al.*, 1994); e também pode clivar peptídeos intracelulares apresentados por moléculas MHC de classe I (Garcia *et al.*, 1997).

Ademais, as sinaptotagminas (Syts) são proteínas de membrana que controlam a fusão de vesículas em processos celulares como exocitose e fagocitose, dependendo do cálcio. A Syt XI, presente em macrófagos, regula negativamente a liberação de fatores inflamatórios. A *Leishmania* pode afetar a função da Syt XI, desregulando a liberação desses fatores. Estudos mostraram que a peptidase GP63 da *Leishmania* degrada a Syt XI, aumentando a liberação de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) e a IL-6 (Interleucina-6) após a infecção (Arango Duque; Fukuda; Descoteaux, 2013). A GP63 cliva VAMP8 (vesicle-associated membrane protein 8), responsável por apresentar antígenos ao TCD8+, prejudicando assim processos envolvidos na biogênese do fagolisossomo que são necessário para apresentação cruzada do antígeno (Matheoud *et al.*, 2013).

Isnard e colaboradores forneceram evidências de que em *L. major* a GP63 se localiza no envelope nuclear de macrófagos infectados e está ativo neste compartimento e no nucleoplasma (Isnard *et al.*, 2015), levando a possibilidade de que a GP63 possa estar interferindo na dinâmica nuclear (Contreras *et al.*, 2010), clivando outras proteínas importantes para manter a estrutura e funcionamento celular, alterando também o proteoma do nucleoplasma alterando o DNA.

Para apoiar ainda mais o argumento de que a infecção por *Leishmania* manipula a expressão de proteínas encontradas no núcleo, Singh *et al.* (2015) usaram proteômica para obter uma compreensão global de como a infecção por *L. donovani* reprogramava as células hospedeiras, indicando que o proteoma da célula hospedeira é modulado após a infecção por *L. donovani*, fornecendo evidências de uma reprogramação global do metabolismo celular e demonstrando as complexas relações entre o hospedeiro e o parasito em nível molecular.

Uma outra função atribuída à gp63 é a manipulação do metabolismo do ferro dentro das células hospedeiras. O ferro é essencial para a sobrevivência e replicação do parasito. Estudos revelaram que a *Leishmania* é capaz de inibir o efluxo de ferro das células infectadas, reduzindo a presença da proteína ferroportina, responsável por liberar ferro das células. Isso ocorre devido ao aumento da hepcidina, um hormônio regulador do metabolismo do ferro, nos macrófagos infectados. A gp63 pode estar envolvida no aumento da secreção de IL-6, que pode levar ao aumento da expressão de hepcidina. Essa manipulação resulta em níveis mais altos de ferro intracelular, favorecendo a sobrevivência e replicação do parasito (Arango Duque; Fukuda; Descoteaux, 2013).

O colesterol é um componente crucial para a estrutura das células e sua função. Durante a infecção por *Leishmania*, os parasitos usam uma GLP para degradar as plataformas lipídicas (lipid rafts) que contêm colesterol, facilitando sua entrada nas células hospedeiras. Isso interrompe as vias de sinalização e enfraquece o sistema de defesa celular, conhecido como fagolisossomo (Dermine *et al.*, 2005; Vinet *et al.*, 2009; Winberg *et al.*, 2009). Pacientes com leishmaniose visceral tendem a ter níveis mais baixos de colesterol no sangue (Ghosh *et al.*, 2011). Um estudo destacou a importância do colesterol na infecção por *Leishmania*, mostrando que a proteína gp63 cliva a proteína DICER1 em células hepáticas infectadas, diminuindo os níveis de um regulador chave, o miR-122. Isso resulta em uma redução da síntese de colesterol e na sobrevivência prolongada dos parasitos (Ghosh *et al.*, 2013).

Estudos mostram que a infecção por *L. donovani* induz mudanças epigenéticas na metilação do DNA do hospedeiro para permitir a diferenciação e replicação da sobrevivência de *L. donovani* dentro do macrófago infectado. Acredita-se que a proteína gp63 de *Leishmania* possa exercer uma influência indireta na metilação do DNA do hospedeiro. Os estudos conduzidos por Isnard *et al.* (ano) sugerem que a gp63 nuclear pode afetar a disponibilidade do DNA para as enzimas de metilação. Os mecanismos exatos dessa influência ainda não foram completamente elucidados, mas as evidências apresentadas apontam para essa possibilidade. Também é provável que os parasitos exportem DNA metiltransferases ou inibidores de

metilação da vacuolização intracelular para o citoplasma, possivelmente através de exossomos derivados do parasita (Marr *et al.*, 2014).

A presença ou ausência de gp63 leva a diferentes expressões genéticas de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, o que reforça a ação deste fator de virulência na imunomodulação da infecção (Hassani *et al.*, 2014). Alguns estudos apontam que essa proteína desempenha atividade inflamatória na infecção por *Leishmania* spp., devido a sua capacidade de aumentar a produção de TNF- α pelos macrófagos (Arango Duque *et al.*, 2014).

Além disso, foram identificadas atividades proteolíticas em diversos gêneros, apresentando propriedades bioquímicas semelhantes às da gp63 e reatividade cruzada com anticorpos desenvolvidos contra a gp63 de *Leishmania*. Esses gêneros incluem *Crithidia* (d'Avila-Levy *et al.*, 2001; D'Avila-Levy *et al.*, 2003), *Herpetomonas* (Nogueira de Melo *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2010), *Blastocrithidia* (D'Avila-Levy *et al.*, 2005, atualmente conhecido como *Strigomonas*, Teixeira *et al.*, 2011), *Leptomonas* (Jaffe; Dwyer, 2003) e *Phytomonas* (D'Avila-Levy, C. M. *et al.*, 2006a; 2006b)

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose, uma doença tropical negligenciada, impacta desproporcionalmente aqueles sem acesso a infraestrutura básica de saúde, especialmente em áreas rurais tropicais e subtropicais (Annadurai, 2023). Sua disseminação envolve complexas interações sociais e ecológicas entre patógenos, vetores, humanos e animais (De Brito *et al.*, 2023).

Leishmania infantum, causadora da Leishmaniose Visceral (LV), é transmitida por flebotomíneos, infectando células no hospedeiro e tornando-se amastigotas intracelulares (Serafim; Iniguez; Oliveira, 2020). Cães são essenciais como reservatórios domésticos, destacando-se pela alta prevalência da infecção (Alvar *et al.*, 2004; Quinnell; Courtenay, 2009).

Um caso de infecção natural por *Leishmania* spp. em um felino doméstico (*Felis catus*) foi inicialmente documentado em 1912, na Argélia. O paciente era um felino de quatro meses de idade que compartilhava o ambiente com um cão e uma criança, ambos também diagnosticados com a forma visceral da doença (Sergent *et al.*, 1912). O diagnóstico foi estabelecido com base na presença de formas amastigotas do parasito na medula óssea do cão.

Penissi *et al.* (2000) relataram um aumento significativo de 61% de casos de leishmaniose felina em determinadas populações de gatos, mostrando que estaria havendo um aumento da investigação ativa do protozoário neste hospedeiro, havendo também

aprimoramento das técnicas diagnósticas e aumento atual na taxa de prevalência da doença em gatos domésticos (Silva Neto *et al.*, 2015).

Devido ao aumento dos casos relatados de *Leishmania* spp. e, especialmente, de *L. infantum* em gatos domésticos e a ocorrência de infecção em gatos em Teresina-PI (Mendonça *et al.*, 2017), tornando esta cidade um cenário ideal para investigação da leishmaniose felina.

Pesquisas revelaram que a expressão de gp63, presente na superfície de todas as promastigotas de *Leishmania*, passa por alterações dependendo da cepa de *Leishmania* e de sua capacidade de interagir com macrófagos. Essas descobertas corroboram a importância das peptidases na virulência do gênero, desempenhando papéis cruciais em processos como nutrição, invasão celular, sobrevivência intracelular, diferenciação e proliferação, sugerindo que a análise comparativa da atividade proteolítica em cepas com diferentes padrões de virulência pode contribuir significativamente para a compreensão do papel dessas enzimas durante a infecção no hospedeiro (Lima *et al.*, 2009).

Na literatura ainda não existem estudos analisando a molécula de gp63 em *Leishmania infantum* recuperados de gatos. A detecção de metalopeptidases do tipo gp63 pode fornecer uma compreensão mais profunda da virulência de *L. infantum* em gatos. Isso não só ajuda a preencher lacunas na literatura científica sobre a detecção dessas metalopeptidases em gatos infectados com *Leishmania*, mas também pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle e tratamento. A detecção dessas metalopeptidases em gatos naturalmente infectados também contribuirá para a pesquisa básica em biologia parasitária, preenchendo possíveis lacunas no entendimento atual sobre a interação parasito-hospedeiro. Dessa forma, a hipótese deste estudo é se existe expressão do fator de virulência gp63 nas cepas de gatos naturalmente infectados.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Investigar a produção de metalopeptidases, com ênfase na gp63, em promastigotas de *Leishmania infantum* isoladas de gatos naturalmente infectados e recuperado na cidade de Teresina, Piauí.

3.2 Específicos:

- Detectar a atividade de peptidase na forma promastigota de *L. infantum* usando substrato fluorogênico peptídico (Z-Phe-ArgAMC);

- Analisar a presença da atividade enzimática da gp63 no extrato celular e no sobrenadante das formas promastigotas da espécie *L. infantum* através de SDS-PAGE contendo gelatina incorporada como substrato;
- Analisar o efeito do 1,10-fenantrolina (inibidor de metalopeptidase) no extrato celular e sobrenadante de formas promastigotas de *L. infantum*;
- Avaliar a expressão da gp63 no extrato celular e no sobrenadante da forma promastigota de *L. infantum* através da técnica de Western blotting;
- Quantificar a presença da gp63 do extrato celular e sobrenadante da forma promastigota em *L. infantum* através da técnica de citometria de fluxo;

4 METODOLOGIA

Com o intuito de tornar mais acessível a compreensão deste estudo, elaborou-se um fluxograma do delineamento experimental global, apresentado na figura 4. Este delineamento visa a análise da molécula GP63 nas formas promastigotas das espécies *L. infantum*, empregando diversas técnicas (**Figura 4**).

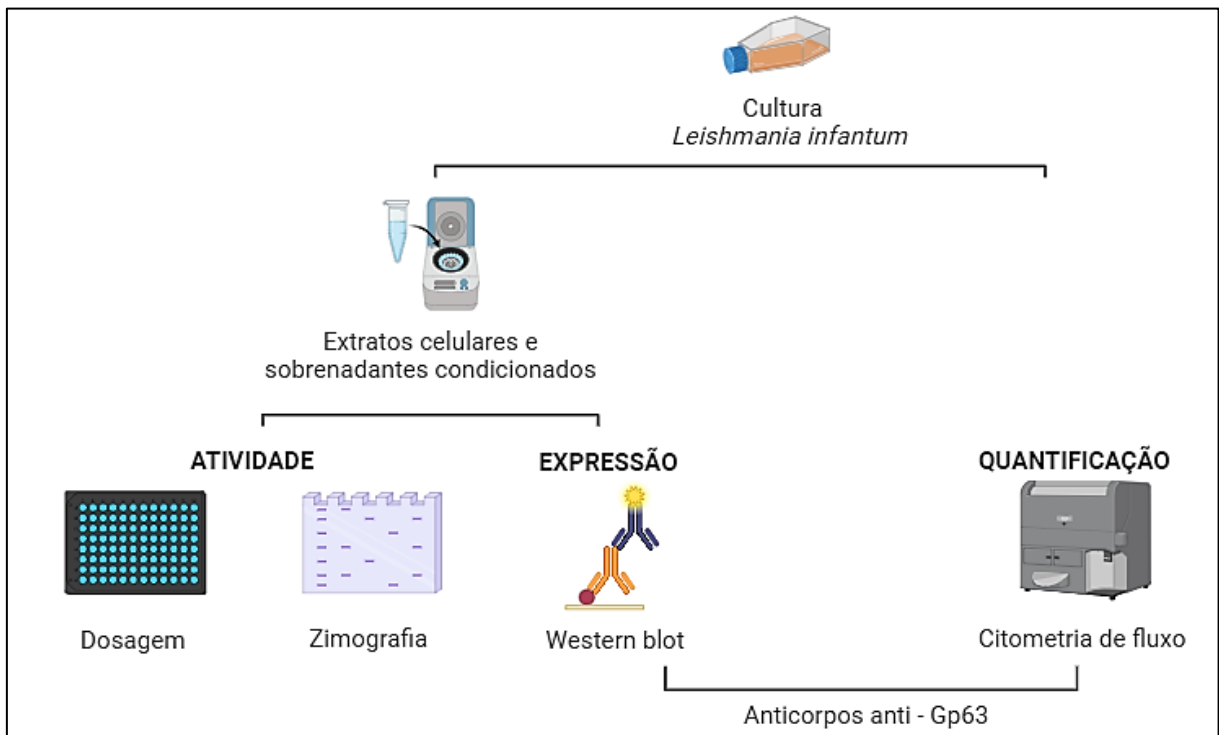


Figura 5. Fluxograma do Delineamento Experimental. Para a análise da molécula gp63 as formas promastigotas das espécies *L. infantum* serão submetidas primeiramente a dosagem enzimática com intuito de avaliar a atividade de peptidase e ensaios de zimografia em gel com o intuito de avaliar a atividade da gp63. Para a análise da expressão proteica será realizado Western Blot utilizando anticorpos anti-gp63. Para a finalização do trabalho,

serão realizados ensaios de citometria de fluxo também utilizando anticorpos anti-gp63 para realizar a quantificação da proteína.

4.1 *Leishmania infantum* e condições de cultivo

As formas promastigotas de *L. infantum* foram obtidas de medula óssea ou linfonodo de seis gatos e identificadas por reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de fragmento de restrição (PCR-RFLP) da região *ITS1* (Batista, 2019) e cedidas pelo LASAN (Laboratório de Sanidade Animal) – Setor de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Piauí (**Tab. 1**). Como referência utilizamos a cepa isolada de paciente humano (MHOM/BR/1974/PP75) cedida pelo LEAMER (Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes) da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As cepas foram cultivadas em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e mantido em estufa a 26 °C em estufa B.O.D. (Biological Oxygen Demand). Repiques foram realizados semanalmente.

Tabela 1. Conjunto de dados referentes aos pacientes diagnosticados com leishmaniose felina, meticulosamente investigados e analisados no âmbito deste estudo. As informações abrangem sexo do animal investigado, idade, raça e sinais clínicos que foram previamente investigados em um estudo epidemiológico de leishmaniose visceral felina em Teresina, Piauí.

CEPA	SEXO	IDADE	RAÇA	SINAIS CLÍNICOS
G173	M	2a1m	SRD	Emagrecimento, linfonodos aumentados, blefarite, uveíte, cegueira, alopecia periocular e lesão periocular
G187	F	3a1m	SRD	Alopecia facial
G196	M	3a1m	SRD	Linfonodo aumentado
G274	M	ND	SRD	Alopecia generalizada, emagrecimento, linfonodos aumentados, lesões nas orelhas e face
G322	M	8a	SRD	Lesão na face, linfonodo aumentado, emagrecimento, alopecia nas orelhas
G971	F	3a1m	SRD	Blefarite, lesão periocular, alopecia periocular, emagrecimento, linfonodo aumentado

Legenda: M = macho, F = fêmea, a = anos, m= meses, SRD= sem raça definida . Fonte: Batista (2019).

4.2 Obtenção do extrato celular e do sobrenadante condicionado de cultivo

Promastigotas de *L. infantum* foram cultivados em meio Schneider durante 72 h a 28°C. Após esse período, as culturas foram centrifugadas (4.000×g, a 4 °C por 10 min) para separar sobrenadante de cultivo e células. O sobrenadante de cultivo livre de células (sobrenadante condicionado) foi concentrado em um sistema Centricon, utilizando uma membrana de exclusão de 10 kDa. Paralelamente, os parasitos obtidos foram lavados 2 vezes com PBS e ressuspensos em Triton X-100 a 0,1% (v/v) para que as células fossem rompidas. Para tal, as

células foram lisadas em vórtex na presença de pérolas de vidro através de 5 ciclos de 20 seg, alternados com 5 min em banho de gelo. O lisado obtido foi centrifugado ($10.000\times g$, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min) e o sobrenadante utilizado para avaliação da atividade proteolítica referente ao extrato celular. A concentração de proteínas do sobrenadante condicionado e do extrato celular foi determinada pelo método descrito por LOWRY *et al.*, (1951), usando-se albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

4.3 Dosagem enzimática da atividade peptidásica

A atividade proteolítica nos extratos celulares e nos sobrenadantes condicionados de *L. infantum*, em pH 10,0, foi determinada usando-se o substrato peptídico fluorogênico metilcumarínico Z-Phe-ArgAMC. Uma solução estoque desse substrato a 5 mM foi preparada em DMSO e, a partir deste estoque, foi realizada uma diluição de modo a obter uma concentração final de 120 μM . Em placa de 96 poços preta, as reações foram iniciadas pela adição do substrato fluorogênico, a uma concentração final de 10 μM , em um volume referente a 5 μg de proteínas de cada extrato proteico (celular ou sobrenadante), sendo completado o volume final de 100 μL por poço com tampão glicina-NaOH, pH 10,0. Em paralelo, foram feitos sistemas controle na presença do inibidor de metalopeptidases 1,10-fenantrolina (FNT) a 2 mM em pH 10,0. A clivagem do substrato foi monitorada durante 120 min a 37°C pela liberação do fluoróforo AMC (7-amino-4-metilcumarina), utilizando-se um comprimento de onda de excitação de 380 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm (Gontijo, 2011). A atividade enzimática foi expressa em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

4.4 Análise das peptidases por eletroforese em gel

Para realização desse procedimento, os extratos celulares e os sobrenadantes condicionados foram adicionados com tampão de amostra para SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) (Tris 125 mM, pH 6,8; 4% de SDS; 20% de glicerol e 0,002% de azul de bromofenol), na proporção de 1:1, ao volume correspondente a 100 μg de proteínas de cada extrato (celular e sobrenadante) obtido conforme descrito no item 4.2. Essas amostras foram submetidas então à SDS-PAGE a 10%, usando-se 0,1% de gelatina como substrato proteico (Heussen; Dowdle, 1980). Esse processo foi realizado sob uma corrente de 200 V e 20 mA por gel, a 4°C . Após a corrida, os géis foram incubados em Triton X-100 a 2,5%, para a remoção do SDS, durante 1 h sob agitação constante. Em seguida, foram mantidos por 48 h a 37°C na presença de 20 mL de tampão fosfato de sódio a 50 mM,

pH 5,0, suplementado com 10% ditioneitol (DTT), ou tampão glicina-NaOH a 50 mM, pH 10,0. Paralelamente, o inibidor de metalopeptidases 1,10-fenantrolina (1 mM) foi adicionado aos tampões de incubação. Finalmente os géis foram corados com 0,2% de Coomassie Brilliant Blue R-250 em metanol : ácido acético : água (50:40:10) e descorados numa solução contendo os mesmos solventes na proporção 85:5:10 (Santos *et al.*, 2005).

4.5 Western blotting

Os extratos celulares e os sobrenadantes condicionados foram adicionados ao tampão de amostra de eletroforese em gel (Tris 125 mM, pH 6,8, 4% de SDS, 20% de glicerol e 0,002% de azul de bromofenol) e misturado com 5% de 2- β -mercaptoetanol, seguido de aquecimento a 100°C por 5 min. As proteínas foram separadas em eletroforese SDS-PAGE 10%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas electroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose, sob uma tensão de 100 V/300 mA durante 2 h, a 4°C. Após a transferência, a membrana foi bloqueada em 5% de leite em pó com baixo teor de gordura em TBS (150 mM NaCl; 10 mM Tris, pH 7,4) contendo 0,5% de Tween 20 (TBS/Tween) por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes (10 min cada lavagem) com TBS-Tween 0,1% e incubadas com anticorpo anti-gp63 (criado contra a molécula gp63 recombinante de *L. mexicana* e gentilmente cedido por Peter Overath da Max-Planck - Institut für Biologie, Abteilung Membranbiochemie, Alemanha). Após esse período, a membrana foi lavada três vezes com TBS-Tween a 0,1% e depois incubada com o anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho conjugado com peroxidase na proporção de 1:25.000. Finalmente, a membrana foi lavada novamente com o mesmo tampão e revelada por detecção de quimioluminescência após reação com imunorreagentes ECL e analisada por ImageQuant™ LAS 4000. A massa molecular de cada proteína foi calculada comparando-a com padrões de massa molecular (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

4.6 Localização da gp63 por citometria de fluxo

Parasitas da fase logarítmica (5×10^6 células) usados para estes experimentos foram fixados com paraformaldeído a 0,4% durante 5 min, seguido de lavagem extensa com PBS. Em paralelo, para avaliar a expressão da gp63 intracelular, os parasitos foram fixados e permeabilizados com paraformaldeído a 4% por 15 min à temperatura ambiente. Após este período, os promastigotas, fixados ou fixados e permeabilizados, foram lavados em PBS e então

incubados por 1 h com uma diluição de 1:500 de anticorpo anti-gp63. Em seguida, foram lavados novamente em PBS e incubados com uma diluição de 1:250 de imunoglobulina G (IgG) de cabra anti-coelho marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), durante 1 h. Finalmente, as células foram lavadas mais 3 vezes com PBS analisadas em citômetro de fluxo equipado com um laser de argônio de 15 mW emitindo a 488 nm. As células não tratadas e as tratadas apenas com o anticorpo secundário foram analisadas em paralelo como controles. Paralelamente, alterações morfológicas foram evidenciadas pela análise dos parâmetros de FSC e SSC, que avaliam dois parâmetros morfométricos, tamanho celular e granularidade, respectivamente. Os dados representaram a análise de 10.000 eventos e os resultados foram expressos como porcentagem de células fluorescentes (Sangenito *et al.*, 2009).

4.7 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados por meio do programa GraphPad Prism® 6.0, os grupos foram comparados por ANOVA ou test t de Student, considerando significância estatística $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Detecção de atividade peptidásica usando substrato fluorogênico

O substrato Z-Phe-Arg-AMC é uma molécula composta por aminoácidos seguidos por uma molécula fluorogênica AMC (7-amino-4-metilcoumarina). A presença da AMC permite a detecção de fluorescência quando o peptídeo é clivado por uma peptidase. Assim, na presença de peptidase ativa, o substrato Z-Phe-Arg-AMC será clivado em produtos menores, liberando a molécula fluorogênica AMC. Portanto, a intensidade da fluorescência gerada é proporcional à atividade da peptidase presente na amostra.

O estudo da atividade enzimática utilizando o substrato Z-Phe-Arg-AMC a pH 10,0 do extrato celular e do sobrenadante condicionado de cultivo dos diferentes isolados de *L. infantum* revelou padrões distintos entre as cepas investigadas (**Fig. 7**).

Destaca-se que, de uma forma geral, os extratos celulares exibiram atividade proteolítica superiores em comparação aos sobrenadantes condicionados, indicando uma predominância de atividade no meio celular em relação ao meio extracelular (**Fig. 7**). No extrato celular, a cepa G173 demonstrou uma atividade de peptidase de aproximadamente 2.600 UAF, enquanto a cepa G971 exibiu uma atividade consideravelmente menor (aproximadamente 600 UAF). A atividade enzimática da cepa G274 foi ainda mais baixa, totalizando aproximadamente 100 UAF (**Fig. 7-A**). Já nos sobrenadantes, observou-se que a cepa controle (isolada de paciente humano) exibiu uma atividade enzimática de peptidase mais elevada (aproximadamente 800 UAF), enquanto a cepa G971 demonstrou uma atividade enzimática reduzida, de aproximadamente 100 UAF (**Fig. 7-B**).

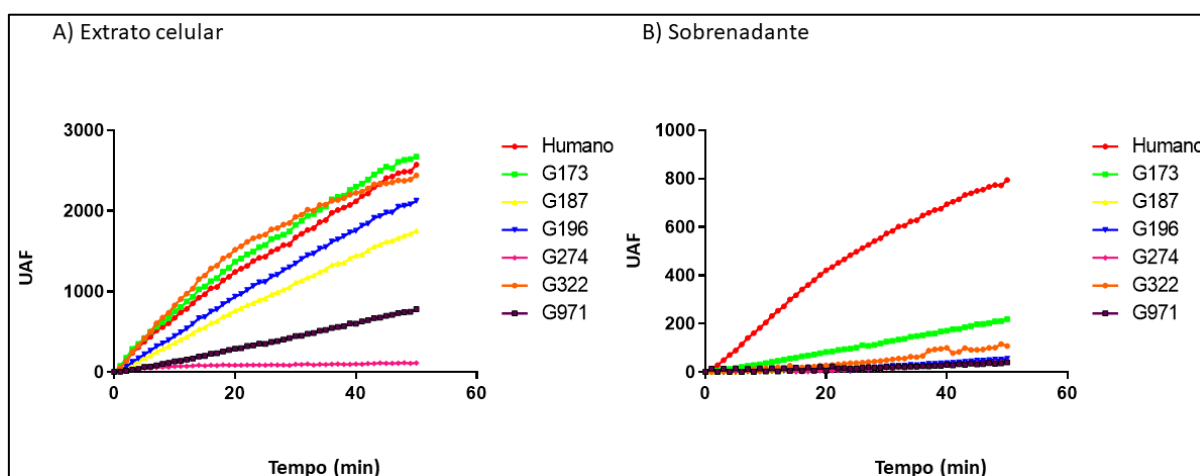


Figura 6. Análise da Variação Temporal da Atividade Enzimática de Peptidase Presentes em Cepas de *L. infantum*: O gráfico ilustra o perfil dinâmico da atividade enzimática utilizando o substrato Z-Phe-Arg-AMC (pH 10,0) no extrato celular (A), evidenciando a notável atividade da cepa G173, e no sobrenadante (B), onde a cepa

controle humano exibe maior atividade em comparação às cepas de gatos de *L. infantum*. A avaliação foi conduzida ao longo de 60 minutos, proporcionando uma visão temporal das variações na atividade enzimática entre as diferentes cepas estudadas.

Em seguida, analisamos as amostras utilizando FNT (inibidor de metalopeptidases), as quais na presença de FNT foram fortemente inibidas, reduzindo significativamente suas atividades enzimáticas como mostra a **Fig. 8-A**. No sobrenadante, as amostras também foram inibidas na presença de FNT (**Fig. 8-B**). Essa observação indica que os extratos celulares e sobrenadantes de diferentes isolados de *L. infantum* exibem atividades de metalopeptidases, pois sua reação enzimática foi fortemente inibida pelo inibidor clássico desta classe de peptidases, a 1,10-fenantrolina.

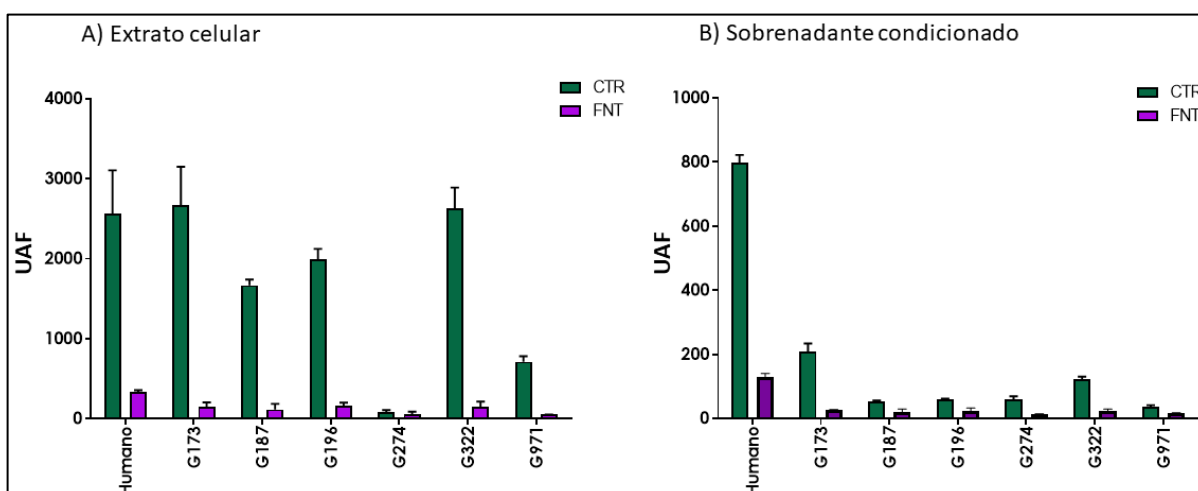


Figura 7. Análise de Metalopeptidases Inibidas por 1,10-Fenantrolina (inibidor clássico de metalopeptidases) em Promastigotas de *L. infantum*: Análise da hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-AMC por gp63 na ausência (controle) ou presença de 1,10-fenantrolina 10 mM no Extrato celular (A) e no Sobrenadante condicionado (B). Os resultados são expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

5.2 Análise zimográfica

Em análises zimográficas, os extratos celulares e os sobrenadantes condicionados de diferentes isolados de *L. infantum* revelaram atividade gelatinolítica. Nos extratos celulares de formas promastigotas, em pH 10,0 os ensaios zimográficos revelam bandas de atividade enzimática com massas moleculares de 63 kDa nas cepas paciente humano, G173, G187, G196, G274, G322 e G971. Já em pH 5,0 observamos duas bandas de aproximadamente 63 kDa nas cepas paciente humano, G173, G187 e G322, enquanto nas cepas G196, G274 e G971 observamos somente uma banda de 63 kDa. Nota-se que a atividade enzimática foi mais forte

em pH 5,0 (**Fig. 9-A e B**). Posteriormente, os géis foram incubados em FNT, onde observamos a inibição das atividades peptidásicas (**Fig. 9-C e D**).

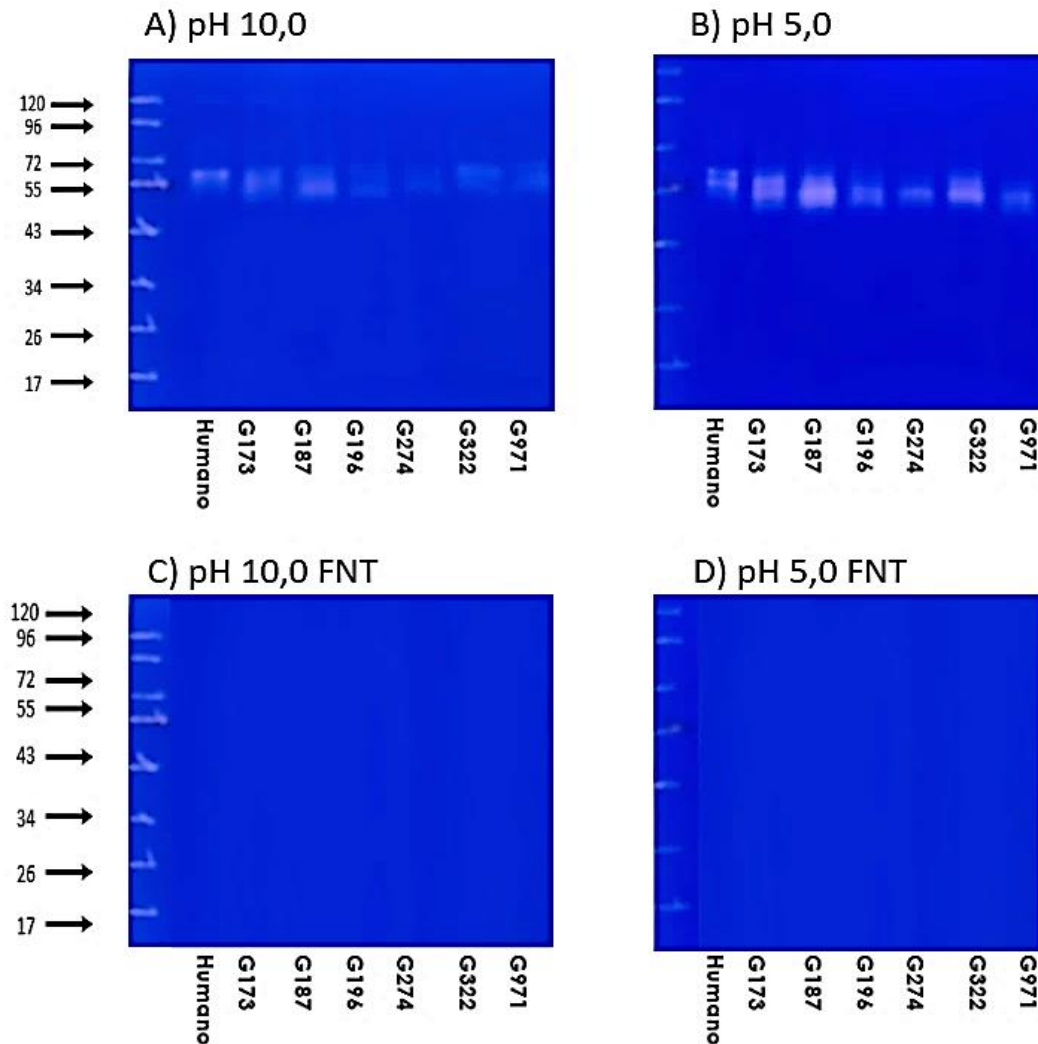


Figura 8. Identificação de Peptidases no Extrato Celular de *L. infantum*: Promastigotas de *L. infantum* foram submetidas a lise (A, B) para a detecção de atividade proteolítica em gel de SDS-PAG-gelatina a pH 10,0 e pH 5. A banda de 63 kDa foi notavelmente destacada em todas as cepas, com intensidade mais pronunciada em pH 5. Na presença (C e D) de 1,10-fenantrolina (FNT) a 1 mM, todas as cepas foram inibidas, sugerindo a natureza metalopeptidásica das enzimas responsáveis pela atividade proteolítica. Esses resultados indicam a presença e a inibição de metalopeptidases nas cepas estudadas.

No sobrenadante, os ensaios zimográficos das amostras detectou duas bandas de atividade enzimática em pH 10,0 de aproximadamente 63 kDa nas cepas Paciente humano e G173 e uma banda proteolítica nos demais isolados (**Fig. 10**).

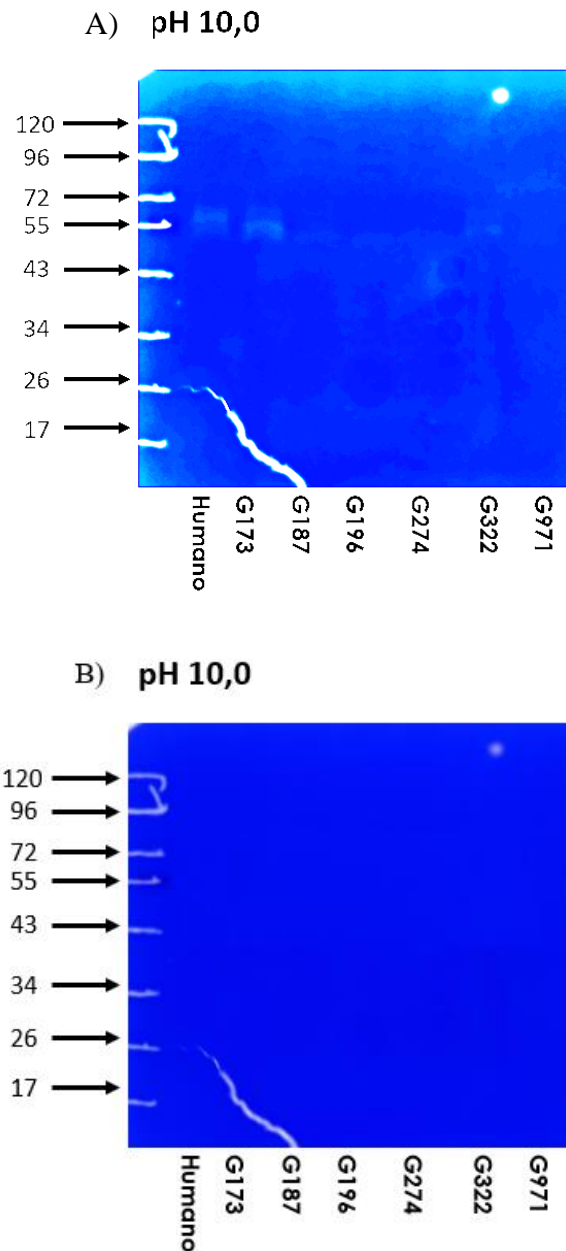


Figura 9. Identificação de Peptidases no Sobrenadante de *L. infantum*: Promastigotas de *L. infantum* foram submetidas à hidrólise, e os sobrenadantes resultantes foram utilizados para a detecção de atividade proteolítica em gel de SDS-PAGE-gelatina em pH 10,0. Em (A) bandas de atividade enzimática em pH 10,0 de aproximadamente 63 kDa foram identificadas nas cepas Paciente humano e G173. Na presença (B) de 1,10-fenantrolina (FNT) a 1 mM, todas as cepas foram inibidas, sugerindo a natureza metalopeptidásica das enzimas responsáveis pela atividade proteolítica. Esses resultados indicam a presença e a inibição de metalopeptidases no sobrenadante das cepas estudadas.

5.3 Western Blotting

Para avaliar a possível relação dessas enzimas com a metalopeptidase gp63, foram analisados extratos totais e sobrenadantes condicionados de promastigotas em fase log utilizando um anticorpo policlonal específico contra a gp63. No extrato celular, este anticorpo

demonstrou forte reatividade, reconhecendo distintas bandas polipeptídicas no controle (paciente humano) com massas moleculares de 45 kDa, 63 kDa, 96 kDa e 100 kDa. Notavelmente, o lisado das cepas de gato G173 apresentou um perfil reativo em torno de 45 kDa, enquanto as cepas isoladas de gatos (G187, G196, G274, G322 e G971) exibiram um perfil reativo em aproximadamente 63 kDa (**Fig. 11-A**). Os padrões de bandas revelados pelo anticorpo anti-gp63 assemelham-se aos previamente observados na análise zimográfica, conforme detalhado na seção 5.1. O sobrenadante apresentou um perfil reativo na cepa controle entre 63 kDa, 96 kDa e 120 kDa, enquanto as cepas de gato apresentaram um perfil reativo na faixa de 63 kDa (**Fig. 11-B**).

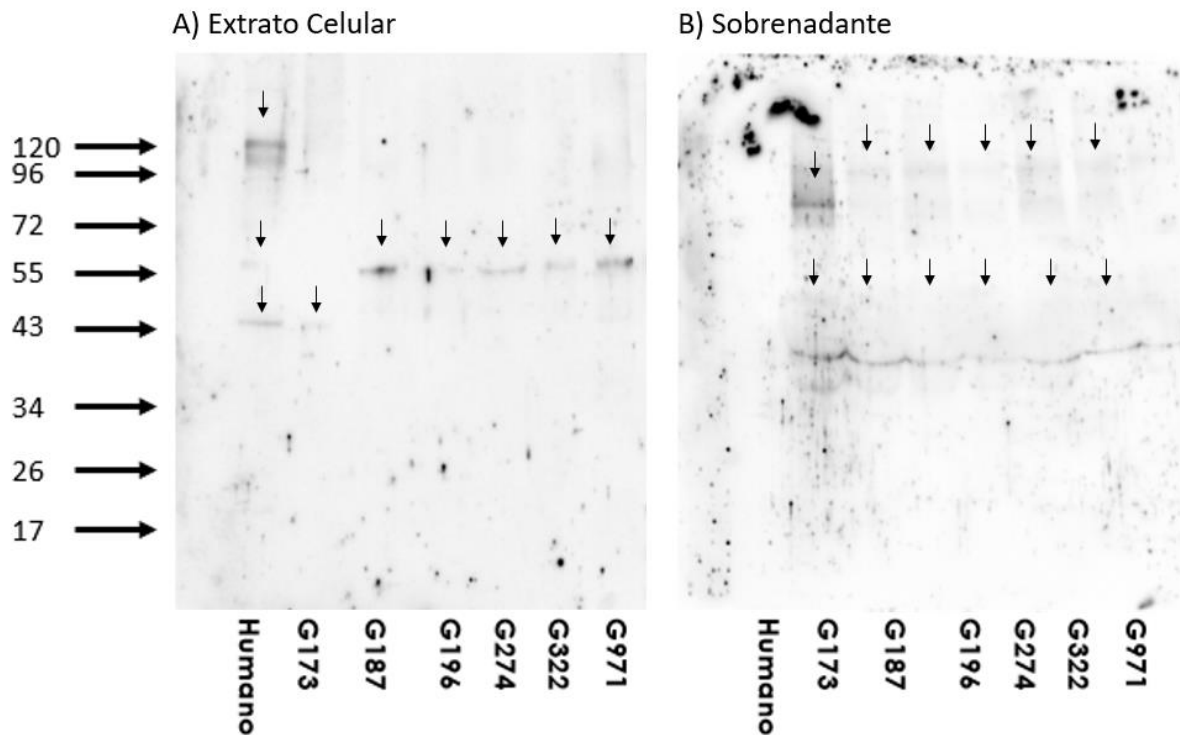


Figura 10. Western blot revelando polipeptídeos com domínios homólogos à gp63, detectados no extrato celular e sobrenadante do cultivo de promastigotas de fase log tardia de *L. infantum*, isolados de pacientes felinos com leishmaniose visceral. Os números à direita indicam a massa molecular aparente dos polipeptídeos reativos, destacando-se as bandas em 45 kDa, 63 kDa, 96 kDa, 100 kDa e 120 kDa.

5.4 Citometria de fluxo para detecção de gp63 intracelular e de superfície celular

O estudo da expressão da proteína gp63, crucial para as promastigotas, foi conduzido em diferentes cepas, incluindo a cepa controle humana e felinas (G173, G187, G196, G274, G322, G971). A análise da expressão da gp63 foi realizada na superfície celular, não permeabilizadas (NP) e no interior da célula, células permeabilizadas (P), proporcionam insights sobre a distribuição e intensidade dessa proteína.

O gráfico de percentual de células marcadas mostra a proporção de células analisadas que apresentam resultado positivo para gp63 em relação ao número total de células analisadas. A média do percentual de células marcadas não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre células permeabilizadas e não permeabilizadas. As cepas controle (paciente humano) e G322 se destacaram, revelando um percentual de marcação elevado em ambas as condições, tanto em células não permeabilizadas (NP) quanto permeabilizadas (P), atingindo aproximadamente 90% da população analisada. Em contraste, a cepa G274 exibiu um percentual de marcação inferior em ambas as condições, marcando cerca de 50% da população avaliada (**Fig. 12-A**).

O parâmetro de intensidade de fluorescência é um parâmetro quantitativo utilizado na citometria de fluxo para medir a intensidade média do sinal de fluorescência associado a uma população de células marcadas com fluoróforos. Este parâmetro fornece uma medida média da quantidade de fluorescência emitida por cada célula permeabilizada e não permeabilizada. Ao contrastar as cepas não permeabilizadas e permeabilizadas, observou-se que G196, G173 e G971 exibiram menor intensidade de fluorescência quando não permeabilizadas, enquanto G187 apresentou a maior intensidade entre as cepas nesse contexto. Por outro lado, as cepas G196 e G274 demonstraram menor intensidade em células permeabilizadas, enquanto a cepa controle (Paciente humano) e G187 exibiram maior intensidade em células permeabilizadas (**Fig. 12-B**).

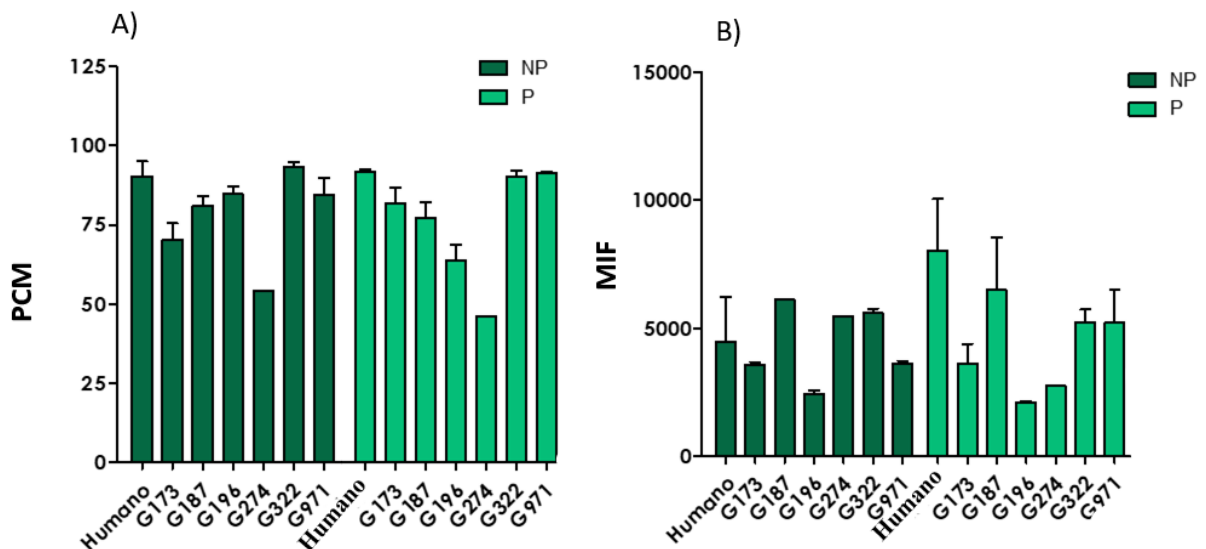


Figura 11. Análise de Citometria de fluxo em promastigotas de *L. infantum*: A) Percentual de Células Marcadas (PCM), indicando a proporção de células positivas para gp63 em relação ao total de células analisadas. B) Representação da Média de Intensidade de Fluorescência (MIF). Ambos os parâmetros foram avaliados na superfície celular (NP - Não Permeabilizado) e no interior da célula (P - Permeabilizado), fornecendo uma análise abrangente da expressão de gp63 em diferentes compartimentos celulares.

6 DISCUSSÃO

Leishmania infantum é uma das espécies causadoras de leishmaniose visceral (calazar) e está presente na América do Sul, na bacia do Mediterrâneo e na Ásia Ocidental e Central (Serafim; Iniguez; Oliveira, 2020). A LF aparece como uma doença felina cada vez mais relatada em áreas endêmicas e esporadicamente em áreas não endêmicas (Basso *et al.*, 2016; Brianti *et al.*, 2017; Maia *et al.*, 2015; Rüfenacht *et al.*, 2005).

A patogênese da *Leishmania* é resultante de fatores de virulência, os quais capacitam o parasito a invadir os seus hospedeiros e provocar infecção. As peptidases de *Leishmania* desempenham funções cruciais na migração do parasito pelos tecidos do hospedeiro, além de degradar proteínas associadas ao sistema imunológico para evadir as respostas imunitárias (Sajid; McKerrow, 2002). Dentre um arsenal de fatores de virulência que permitem aos parasitos infectarem, sobreviverem e se replicarem dentro das células hospedeiras, está inclusa uma glicoproteína de 63 kDa chamada GP63 ou leishmanolisina. (Yao; Donelson; Wilson, 2003).

A principal glicoproteína de superfície da *Leishmania*, conhecida como GP63, contém um metal dependente de zinco em seu sítio catalítico. A expressão dessa enzima acompanha o ciclo de desenvolvimento do parasita, sendo o principal componente da superfície celular das promastigotas metacíclicas (Bouvier; Etges; Bordier, 1985; Etges; Bouvier; Bordier, 1986). Estudos têm demonstrado que a GP63 está envolvida na evasão do parasita aos fatores da resposta humoral, conferindo resistência às promastigotas contra a citólise mediada pelo complemento (Brittingham *et al.*, 1995). Além disso, a GP63 participa da adesão das promastigotas aos macrófagos por meio de endocitose mediada por receptor (Chang; Chang, 1986; Russell; Wilhelm, 1986) e promove proteção contra a degradação parasitária dentro do fagolisossomo do macrófago (Chaudhuri *et al.*, 1989).

Esta pesquisa continua a investigação das cepas previamente estudadas por Batista (2019) em sua tese de doutorado, na qual abordou a leishmaniose felina em Teresina, Piauí. No contexto deste trabalho, realizou-se uma análise das cepas da espécie *L. infantum* isoladas de gatos, com ênfase na avaliação da expressão e atividade da enzima GP63. A importância deste estudo é destacada pela significativa contribuição para o entendimento da leishmaniose em gatos, uma vez que a expressão da gp63 em diversas cepas de *L. infantum* acrescenta uma melhor compreensão da doença nessa espécie. Além disso, é crucial ressaltar que gatos naturalmente infectados desempenham um papel infeccioso para flebotomíneos, e há especulações de que possam servir como uma fonte de infecção para cães e humanos

(Mendonça *et al.*, 2020; Vioti *et al.*, 2022). Essa associação direta entre a expressão da gp63 e a potencial transmissão do parasito destaca a relevância desse estudo.

Nesta pesquisa, iniciamos a investigação das amostras confirmando se a atividade identificada está associada à atividade enzimática de peptidase nas amostras de *L. infantum*. Para isso, avaliamos a capacidade da enzima gp63 de hidrolisar o substrato Z-Phe-Arg-AMC em um ambiente alcalino, após 1 hora de reação, constatamos uma atividade condizente com peptidases. Ao utilizar 1,10-fenantrolina, um inibidor de metalopeptidase, notamos uma marcante redução na atividade enzimática das cepas examinadas, o que sugere a presença de metalopeptidases. O mecanismo inibitório de 1,10-fenantrolina e de outros inibidores de metalopeptidases é geralmente atribuído à sua capacidade como um poderoso agente quelante. Esse composto é capaz de sequestrar íons zinco do sítio ativo da gp63, resultando na incapacidade da enzima de degradar substratos proteicos, impedindo, possivelmente, processos como a captação de nutrientes, interação com possíveis receptores presentes em células intestinais do hospedeiro invertebrado, macrófagos e/ou moléculas de superfície ligantes dos parasitos.

O estudo de Pourshahid *et al.* (2022) revelou que durante a fase estacionária, não houve atividades de gelatinase nos extratos promastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica*. No entanto, em *L. infantum*, foram identificadas três bandas de protease em seus extratos celulares, com massas moleculares de 120, 92 e 86 kDa. Nas secreções extracelulares das três espécies de *Leishmania* nesta fase, foram encontradas bandas de peptidases com massas moleculares semelhantes de 92 e 72 kDa.

Cuervo *et al.* (2006) identificou, por meio de ensaios zimográficos em extratos e sobrenadantes de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* obtidos de diferentes pacientes humanos, bandas de alta massa molecular, variando de 50 a 125 kDa, sem diferenças notáveis no SDS-PAGE. Também foram identificadas bandas entre 35 kDa e 120 kDa em *Leishmania (Viannia) braziliensis*, obtidos de diferentes pacientes humanos (Cuervo *et al.*, 2008). Além disso Azambakhtiar *et al.* (2023) identificou uma metalopeptidase de 63 kDa em exossomos e lisados de promastigotas de *L. major*.

Além disso, em 36 cães afetados por LV, foram identificadas bandas de proteínas com massas moleculares variando entre 66 kDa e 92 kDa em amastigotas de *L. infantum* (Jacintho *et al.*, 2018). Quatro espécies de *Leishmania* foram analisadas por Monteiro (2015): formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* isolado de paciente humano, *L. guyanensis*

isolado de paciente humanos, *L. infantum* isolado de paciente canídeo e *L. shawi* isolado de paciente humano . Todas as quatro espécies de *Leishmania* apresentaram atividade proteolítica mediada por uma enzima de peso molecular situado entre os 50 kDa e 80 kDa, onde o perfil de expressão de metalopeptidases de *L. shawi* é distinto comparativamente às restantes espécies de *Leishmania* por exibir menor massa molecular possivelmente derivado de um diferente estado de glicosilação.

Em outros tripanossomatídeos, como *Crithidia guilhermei* (Nogueira de Melo *et al.*, 2001), *C. fasciculata* e *C. oncopelti* (d'Avila-Levy *et al.*, 2001), além de *Phytomonas françai* (Almeida *et al.*, 2003), *Herpetomonas samuelpessoai* (Santos *et al.*, 2003) *Phytomonas serpens* (D'Avila-Levy *et al.*, 2006), *Herpetomonas megaseliae* (Nogueira de Melo *et al.*, 2006), *Crithidia deanei* (d'Avila-Levy *et al.*, 2008), *Leptomonas collosoma*, *Leptomonas samueli* e *Leptomonas wallacei* (Pereira *et al.*, 2009) e *Trypanosoma cruzi* (Rebello *et al.*, 2019) foram identificadas enzimas semelhantes migrando na faixa de 60-90 kDa em SDS-PAGE/gelatina, conforme relatado pelo nosso grupo de pesquisa. Esses resultados sugerem variações na expressão de peptidases entre as diferentes espécies de tripanossomatídeos.

Em nossa pesquisa, observamos a enzima gp63 de *L. infantum* mostraram atividade principalmente em pH 5,0, este achado é de particular relevância para a *Leishmania* como parasita no compartimento ácido dos fagolisossomos para sua sobrevivência e replicação dentro das células hospedeiras. O estudo de Cuervo *et. al.* (2006) corrobora com nossos resultados onde o pH ótimo foi de 5,5 para as promastigotas obtidas de diferentes pacientes humanos analisadas de *L. (Viannia) braziliensis*. Em outra espécie de tripanossomatídeo, *Phytomonas françai*, Almeida *et. al.* (2002), encontrou um pH ótimo igual a 5 para a peptidase encontrada.

A coincidência marcante entre os padrões que vemos nas análises de Western blot e zimogramas sugere que as cepas de *L. infantum* produzem várias enzimas do tipo metalopeptidases, que são homólogas à gp63. No entanto, é importante notar que não encontramos sinais de uma atividade específica com uma massa molecular aparente de 45 kDa, 96 kDa, 100 kDa e 120 kDa nos zimogramas. As bandas não identificadas nas análises de Western blot pode estar relacionada a: (i) uma enzima chamada metalopeptidase que ainda está inativa; (ii) a mesma enzima em um estado diferente de modificação pós-traducional (iii) diferentes versões da enzima produzidas por diferentes genes; (iv) um pedaço inativo ou resíduo de degradação semelhante. Essas são possibilidades que devemos considerar, pois já foi observado que a gp63 é produzida inicialmente como algo inativo ou semelhante a um resíduo de degradação. (Kink; Chang, 1988; Macdonald; Morrison; McMaster, 1995; Yao; Donelson;

Wilson, 2003). A banda de aproximadamente 120 kDa expressa poderá corresponder à forma inativada da gp63 que, por ainda deter o pró-peptídeo, apresentou maior massa molecular comparativamente à forma ativa da enzima ou pode evidenciar a agregação de monômeros da enzima (Monteiro, 2015).

A análise detalhada por citometria de fluxo revelou a presença de metalopeptidases homólogas à GP63 na superfície celular, bem como em compartimentos intracelulares da *L. infantum*, afirmação validada pela observação de diferentes padrões de marcações, tamanhos e complexidades entre as cepas, diferentes níveis de proteínas, destacando a diversidade nas características dessas metalopeptidases. Reforçando experimentos já realizados onde foram utilizados biotinação de superfície, citofluorimetria e microscopia imunoeletrônica onde mostraram que três quartos da gp63 de *L. (L.) mexicana*, obtidos de lesões de camundongos, ocorrem na superfície celular, enquanto o restante está localizado intracelularmente (Weise *et al.*, 2000). A gp63 também é liberada pelos promastigotas para o meio extracelular, tanto na forma associada à membrana quanto na forma livre. O mapeamento induzido por anticorpos em células vivas demonstrou que a peptidase de superfície é livre para se mover no plano da membrana, concentrando-se primeiro nas extremidades das células e depois sendo liberada no meio (Chang; Chang, 1986; Fong; Chang, 1982).

Esse estudo representa uma contribuição significativa para o entendimento da leishmaniose em felinos ao evidenciar a expressão da glicoproteína 63 kDa em diferentes cepas de *L. infantum*, o estudo abre caminho para futuras pesquisas que busquem elucidar os mecanismos específicos pelos quais a GP63 influencia a patogenicidade e virulência de *Leishmania* em gatos. Além disso, também lança luz sobre possíveis direções para investigações futuras, visando a compreensão mais aprofundada dos mecanismos subjacentes às manifestações clínicas dessa parasitose em felinos.

Considerando que os gatos manifestam patologias diversas por mecanismos ainda não totalmente compreendidos, este estudo propôs analisar a atividade e expressão da GP63, uma metalopeptidase caracterizada como um fator de virulência desses parasitos, diretamente vinculada à sua infectividade. Nesse contexto, a hipótese central desta pesquisa investigou a variação na expressão da GP63 entre diferentes cepas de *L. infantum* presentes em gatos. Os resultados desta investigação revelaram, pela primeira vez, que as cepas de *Leishmania infantum* obtidas de gatos apresentam expressão da glicoproteína de 63 kDa internamente e na membrana.

7 CONCLUSÕES

- Detectamos a atividade de peptidase na forma promastigota de *L. infantum* obtidas de gatos com leishmaniose visceral.
- O estudo revelou bandas específicas indicando a atividade enzimática proteolítica da glicoproteína 63 kDa no extrato celular e sobrenadante das nossas amostras de promastigotas de *L. infantum*.
- Nossos achados indicaram uma significativa redução na atividade enzimática em presença do inibidor de metalopeptidases 1,10-fenantrolina (FNT), sugerindo que a natureza das peptidases evidenciadas era pertencente à classe de metalopeptidases.
- Os resultados do Western blotting revelaram bandas de 45 kDa, 63 kDa, 96 kDa, 100 kDa e 120 kDa encontradas no extrato celular e sobrenadante, indicando a presença e expressão de metalopeptidases homólogas à gp63 em promastigotas de *L. infantum*.
- Os dados obtidos pela citometria de fluxo forneceram uma análise quantitativa, revelando a distribuição e intensidade da gp63 nas populações celulares de promastigotas de *L. infantum*, sugerindo sua presença em células permeabilizadas (P), no interior celular, e não permeabilizadas (NP), na superfície das promastigotas.

8 REFERÊNCIAS

- AL-KHALAIFAH, H. *et al.* Immune Response of Molluscs. **Molluscs**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/64501>. Acesso em: 7 mar. 2024.
- ALMEIDA, F. V. S. *et al.* Extracellular metalloproteinase activity in *Phytomonas françai*. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 320–322, 2003.
- ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, [s. l.], v. 57, n. 04, p. 1–88, 2004.
- ANNADURAI, K. Neglected Tropical Diseases: Global Perspectives. **Journal of comprehensive health**, [s. l.], v. 11, n. 01, p. 17–18, 2023.
- ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, Brazil, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- AOKI, J. I. *et al.* The impact of arginase activity on virulence factors of *Leishmania amazonensis*. **Current opinion in microbiology**, [s. l.], v. 52, p. 110–115, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31306995/>. Acesso em: 7 mar. 2024.
- ARANGO DUQUE, G.; FUKUDA, M.; DESCOTEAUX, A. Synaptotagmin XI Regulates Phagocytosis and Cytokine Secretion in Macrophages. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 190, n. 4, p. 1737–1745, 2013.
- ASFARAM, S.; FAKHAR, M.; TESHNIZI, S. H. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 25, n. February, p. 1–10, 2019.
- AZAMBAKHTIAR, A. *et al.* Gelatin Zymography of Major Proteases in Exosomes of *Leishmania major* Promastigotes. **Iranian Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 546–553, 2023.
- BASSO, M. A. *et al.* Successful treatment of feline leishmaniosis using a combination of allopurinol and N-methyl-glucamine antimoniate. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28491411/>. Acesso em: 25 nov. 2022.
- BATISTA, J. F. *et al.* Clinical, hematological, biochemical, and histopathological evaluations in domestic cats (*Felis catus*) infected by *Leishmania infantum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. e004723, 2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/8NhnZ4mFkrbHH4DGwMJFLr/?lang=en>. Acesso em: 18 ago. 2023.
- BATISTA, J. F. **Leishmaniose visceral em gatos domésticos (*Felis catus*) em área endêmica no Brasil**. 2019. [s. l.], 2019.
- BATISTA, J. F. *et al.* Transmission of *Leishmania infantum* from cats to dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 1–11, 2020.
- BORDIER, C. The promastigote surface protease of *Leishmania*. **Parasitology today (Personal ed.)**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 151–153, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15462939/>. Acesso em: 21 out. 2022.
- BOUVIER, J. *et al.* Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase. **Molecular and biochemical parasitology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 235–245, 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2608099/>. Acesso em:

15 fev. 2024.

BOUVIER, J. *et al.* Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. **Biochemistry**, [s. l.], v. 29, n. 43, p. 10113–10119, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2271643/>. Acesso em: 14 mar. 2024.

BRANDONISIO, O. *et al.* Interactions between *Leishmania* parasites and host cells. **Parassitologia**, Italy, v. 42, n. 3–4, p. 183–190, 2000.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde: [s. n.], 2014.

BRIANTI, E. *et al.* Prevention of feline leishmaniosis with an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2017.

BRITTINGHAM, A. *et al.* Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 67, n. 9, p. 4477–4484, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10456889/>. Acesso em: 15 jan. 2024.

BRITTINGHAM, A. *et al.* Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Parasitology Today**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 445–446, 1995.

CARDOSO, T. *et al.* *Leishmania braziliensis* isolated from disseminated leishmaniasis patients downmodulate neutrophil function. **Parasite immunology**, [s. l.], v. 41, n. 5, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30815888/>. Acesso em: 7 mar. 2024.

CHANG, C. S.; CHANG, K. P. Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of leishmania-macrophage binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 100, 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/322799/>?report=abstract. Acesso em: 12 mar. 2024.

CHAUDHURI, G. *et al.* Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 264, n. 13, p. 7483–7489, 1989. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925818832604/fulltext>. Acesso em: 21 out. 2022.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K. P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. **Molecular and biochemical parasitology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 43–52, 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3278222/>. Acesso em: 15 fev. 2024.

CONTRERAS, I. *et al.* *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 6, n. 10, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20976196/>. Acesso em: 7 mar. 2024.

CORRADIN, S. *et al.* MARCKS-related Protein (MRP) Is a Substrate for the *Leishmania major* Surface Protease Leishmanolysin (gp63). **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 274, n. 36, p. 25411–25418, 1999.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 361–372, 1990.

CUERVO, P. *et al.* A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. **Parasitology**, [s. l.], v. 132, n. 2, p. 177–185, 2006.

- CUERVO, P. *et al.* Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 143–148, 2008.
- D'AVILA-LEVY, C. M. *et al.* *Crithidia deanei*: Influence of parasite gp63 homologue on the interaction of endosymbiont-harboring and aposymbiotic strains with *Aedes aegypti* midgut. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 118, n. 3, p. 345–353, 2008.
- D'AVILA-LEVY, C. M. *et al.* Differential expression of proteolytic enzymes in endosymbiont-harboring *Crithidia* species. **FEMS microbiology letters**, [s. l.], v. 202, n. 1, p. 73–77, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11506910/>. Acesso em: 15 mar. 2024.
- D'AVILA-LEVY, C. M. *et al.* A metalloproteinase extracellularly released by *Crithidia deanei*. **Canadian journal of microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 10, p. 625–632, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14663496/>. Acesso em: 15 mar. 2024.
- D'AVILA-LEVY, Claudia M. *et al.* Gp63-like molecules in *Phytomonas serpens*: Possible role in the insect interaction. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 439–444, 2006.
- D'AVILA-LEVY, Claudia Masini *et al.* Insights into the role of gp63-like proteins in lower trypanosomatids. **FEMS microbiology letters**, [s. l.], v. 254, n. 1, p. 149–156, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16451193/>. Acesso em: 15 mar. 2024.
- D'AVILA-LEVY, C. M. *et al.* Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont and similarities with virulence factors of pathogenic trypanosomatids. **Parasitology**, [s. l.], v. 130, n. Pt 4, p. 413–420, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15830815/>. Acesso em: 15 mar. 2024.
- DA SILVA, D. T. *et al.* Feline leishmaniosis: hematological and biochemical analysis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. e003823, 2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/nSbwgvKpqdN3MjFT3bwc4qJ/?lang=en>. Acesso em: 15 jan. 2024.
- DA SILVEIRA NETO, L. *et al.* Clinical and epidemiological aspects of feline leishmaniasis in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 1467–1480, 2015.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 149, n. 3–4, p. 139–146, 2007.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 151–156, 2006.
- DE BRITO, R. N. *et al.* Looking through the lens of social science approaches: a scoping review of leishmaniasis and Chagas disease research. **Acta Tropica**, [s. l.], p. 107059, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X23002450>.
- DERMINE, J. F. *et al.* *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 1263–1270, 2005.
- DOS REIS, L. L. *et al.* Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 638–645, 2017.

DOS SANTOS, A. L. S. *et al.* *Herpetomonas samuelpessoai*: Dimethylsulfoxide-induced differentiation is influenced by proteinase expression. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 11–17, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12432457/>. Acesso em: 15 fev. 2024.

ELLIS, M. *et al.* Processing and trafficking of *Leishmania mexicana* GP63. Analysis using GPI8 mutants deficient in glycosylphosphatidylinositol protein anchoring. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 31, p. 27968–27974, 2002.

ETGES, R.; BOUVIER, J.; BORDIER, C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 261, n. 20, p. 9098–9101, 1986. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)67621-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)67621-5).

FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **Journal of cell science**, England, v. 112 (Pt 1, p. 2799–2809, 1999.

FERREIRA, A. W.; MORAES, S. L. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2001.

FONG, D.; CHANG, K. P. Surface antigen change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: Identification by monoclonal antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 79, n. 23 I, p. 7366–7370, 1982.

FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate Immune Activation and Subversion of Mammalian Functions by *Leishmania* Lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, [s. l.], v. 2012, p. 11, 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3317186/>. Acesso em: 7 mar. 2024.

GARCIA, M. R. *et al.* Epitope cleavage by *Leishmania* endopeptidase(s) limits the efficiency of the exogenous pathway of major histocompatibility complex class I-associated antigen presentation. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 1005–1013, 1997. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.1830270430>. Acesso em: 14 mar. 2024.

GHOSH, J. *et al.* Human visceral leishmaniasis: Decrease in serum cholesterol as a function of splenic parasite load. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 267–271, 2011.

GHOSH, J. *et al.* *Leishmania donovani* targets dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 277–288, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.005>.

GODOI, N. F. C. *et al.* Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em felinos domésticos frequentadores de clínicas e hospitais veterinários da cidade de Cascavel, Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 11–16, 2016.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniasis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 181, n. 1, p. 23–30, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.019>.

GREVOT, A. *et al.* Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeIV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic

methods. **Parasite**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 271–275, 2005.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. **Advances in applied microbiology**, [s. l.], v. 82, p. 155–184, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23415155/>. Acesso em: 7 mar. 2024.

HEY, A. S. *et al.* The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 152, n. 9, p. 4542–4548, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7908919/>. Acesso em: 14 mar. 2024.

ILG, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. **Parasitology today (Personal ed.)**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 489–497, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11063860/>. Acesso em: 7 mar. 2024.

ILG, T. *et al.* Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 267, n. 10, p. 6834–6840, 1992.

ILG, T.; HARBECKE, D.; OVERATH, P. The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum. **FEBS letters**, [s. l.], v. 327, n. 1, p. 103–107, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8335086/>. Acesso em: 15 fev. 2024.

ISNARD, A. *et al.* Impact of *Leishmania* Infection on Host Macrophage Nuclear Physiology and Nucleopore Complex Integrity. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. e1004776, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004776>. Acesso em: 14 mar. 2024.

JACINTHO, A. P. P. *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 117, n. 6, p. 1819–1827, 2018.

JAFFE, C. L.; DWYER, D. M. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. **Parasitology research**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 229–237, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12923634/>. Acesso em: 15 mar. 2024.

KINK, J. A.; CHANG, K. P. N-Glycosylation as a biochemical basis for virulence in *Leishmania mexicana amazonensis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 27, n. 2–3, p. 181–190, 1988.

LIMA, A. K. C. *et al.* Dissimilar peptidase production by avirulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: Inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages. **Parasitology**, [s. l.], v. 136, n. 10, p. 1179–1191, 2009.

MA, L. *et al.* An evolutionary analysis of trypanosomatid GP63 proteases. **Parasitology research**, [s. l.], v. 109, n. 4, p. 1075–1084, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21503641/>. Acesso em: 7 mar. 2024.

MACDONALD, M. H.; MORRISON, C. J.; MCMASTER, W. R. Analysis of the active site and activation mechanism of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 1253, n. 2, p. 199–207, 1995.

MACHADO, C. J. S.; SILVA, E. G.; VILANI, R. M. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. **Saúde**

e **Sociedade**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 247–258, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sausoc/a/zQW3Y45cZB5yrKzxwFngZwd/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 15 jan. 2024.

MAIA, C. *et al.* First case of feline leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* genotype E in a cat with a concurrent nasal squamous cell carcinoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 2055116915593969, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28491373>. Acesso em: 21 out. 2022.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis?. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 341–344, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.008>.

MAROLI, M. *et al.* *Phlebotomine sandflies* and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. [S. l.]: **Med Vet Entomol**, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22924419/>. Acesso em: 15 jan. 2024.

MARR, A. K. *et al.* *Leishmania donovani* Infection Causes Distinct Epigenetic DNA Methylation Changes in Host Macrophages. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 10, 2014.

MATHEOUD, D. *et al.* *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 15–25, 2013.

MCGWIRE, B. S. *et al.* Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis. Implications for parasite virulence. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 11, p. 8802–8809, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109072200>.

MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; ENGMAN, D. M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 1008–1010, 2003. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.71.2.1008-1010.2003>. Acesso em: 13 mar. 2024.

MEDINA-ACOSTA, E.; KARESS, R. E.; RUSSELL, D. G. Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 31–45, 1993.

MENDONÇA, I. L. de *et al.* Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 280, n. February, p. 109058, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109058>.

MENDONÇA, I. L. *et al.* *Leishmania infantum* in domestic cats from the municipality of Teresina, state of Piauí, Brazil. **Parasitology Open**, [s. l.], v. 3, 2017.

MONTEIRO, J. **Caracterização bioquímica e propriedades biológicas de diferentes metaloproteínas de tripanossomatídeos (*Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei*)**. 2015. 0–4 f. - Universidade de Lisboa, [s. l.], 2015.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 135, n. 4, p. 2785–2789, 1985. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.135.4.2785>. Acesso em: 15 jan. 2024.

NASCIMENTO, L. F. J. *et al.* Epidemiological and diagnostic aspects of feline leishmaniasis with emphasis on Brazil: a narrative review. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 21–

34, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07372-9>.

NOE, P. *et al.* Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from viscera leishmaniasis endemic area in Brazil. *In:* , 2015. **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:55962257>.

NOGUEIRA DE MELO, A. C. *et al.* *Crithidia guilhermei*: purification and partial characterization of a 62-kDa extracellular metalloproteinase. **Experimental parasitology**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 1–8, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11207108/>. Acesso em: 19 mar. 2024.

NOGUEIRA DE MELO, A. C. *et al.* Peptidases and gp63-like proteins in *Herpetomonas megaseliae*: Possible involvement in the adhesion to the invertebrate host. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 415–422, 2006.

OLIVEIRA, T. M. F. de S. *et al.* Leishmaniose Felina No Brasil. **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Veterinária**, [s. l.], n. May, p. 126–144, 2020.

OMS. **Leishmaniasis**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. .

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. **The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health**. [S. l.]: Elsevier, 2013. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1471492213000755/fulltext>. Acesso em: 15 jan. 2024.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas**. [S. l.: s. n.], 2019.

PAŞA, S. *et al.* Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. **Veterinary parasitology**, [s. l.], v. 212, n. 3–4, p. 389–392, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26277567/>. Acesso em: 5 jan. 2024.

PENNISI, M. G. Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 208, n. 1–2, p. 35–47, 2015.

PENNISI, M. G. *et al.* **LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis**. [S. l.]: BioMed Central Ltd., 2015.

PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M. F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 251, n. December 2017, p. 131–137, 2018.

PEREIRA, F. M. *et al.* Differential influence of gp63-like molecules in three distinct *Leptomonas* species on the adhesion to insect cells. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 347–353, 2009.

PEREIRA, F. M. *et al.* Leishmanolysin-like Molecules in *Herpetomonas samuelpessoai* Mediate Hydrolysis of Protein Substrates and Interaction with Insect. **Protist**, [s. l.], v. 161, n. 4, p. 589–602, 2010.

PEREIRA, A.; MAIA, C. *Leishmania* infection in cats and feline leishmaniosis: An updated review with a proposal of a diagnosis algorithm and prevention guidelines. [S. l.: s. n.], 2021.

PETERS, C. *et al.* Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania mexicana* amastigotes activates complement by triggering the mannan binding lectin pathway. **European journal of immunology**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 2666–2672, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9368624/>. Acesso em: 7 mar. 2024.

- PIANI, A. *et al.* *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. **Microbes and infection**, [s. l.], v. 1, n. 8, p. 589–599, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10611735/>. Acesso em: 7 mar. 2024.
- PIRAJÁ, G. V. *et al.* Leishmaniose Felina- Revisão de Literatura. **Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 203–216, 2013.
- POURSHAHID, P. *et al.* A zymographic study of metalloproteinase activities in whole cell extracts and extracellular secretions of *Leishmania (L.)*, *L. major* and *L. infantum* from Iran. **Annals of parasitology**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 569–585, 2022.
- QI, H.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 167, n. 8, p. 4534–4542, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11591781/>. Acesso em: 7 mar. 2024.
- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. **Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis**. [S. l.: s. n.], 2009.
- REBELLO, K. M. *et al.* Participation of *Trypanosoma cruzi* gp63 molecules on the interaction with *Rhodnius prolixus*. **Parasitology**, [s. l.], v. 146, n. 8, p. 1075–1082, 2019.
- RIBEIRO, R. R. *et al.* Canine Leishmaniasis : An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2018, n. C1, p. 1–12, 2018.
- RODRIGUES, A. C. M. *et al.* Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 1119–1124, 2017.
- RÜFENACHT, S. *et al.* Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 156, n. 17, p. 542–545, 2005.
- RUSSELL, D. G.; WILHELM, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 136, n. 7, p. 2613–2620, 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3950420/>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 120, n. 1, p. 1–21, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11849701/>. Acesso em: 8 mar. 2024.
- SANGENITO, L. S. *et al.* Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms. **Parasitology**, [s. l.], v. 136, n. 4, p. 433–441, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19250597/>. Acesso em: 19 dez. 2023.
- SANTOS, C. *et al.* Cytological analysis for diagnosis of leishmaniasis in an oligosymptomatic cat in an endemic area, Campo Grande, MS, Brazil. [s. l.], p. 59–71, 2018.
- SAVANI, E. S. M. M. *et al.* The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 120, n. 3, p. 229–233, 2004.
- SCHLAGENHAUF, E.; ETGES, R.; METCALF, P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). **Structure**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 1035–1046, 1998. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S096921269800104X/fulltext>. Acesso em:

11 mar. 2024.

SCHNEIDER, P.; GLASER, T. A. Characterization of a surface metalloprotease from *Herpetomonas samuelpessoai* and comparison with *Leishmania major* promastigote surface protease. **Molecular and biochemical parasitology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 277–282, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8479451/>. Acesso em: 15 fev. 2024.

SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E.; OLIVEIRA, F. *Leishmania infantum*. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 80–81, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.006>.

SERGENT, E. *et al.* La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bull Soc Pathol Exot**, [s. l.], v. 5, p. 93–98, 1912.

SHIO, M. T. *et al.* Host cell signalling and *Leishmania* mechanisms of evasion. **Journal of Tropical Medicine**, [s. l.], v. 2012, 2012.

SOUSA, R. L. T. de *et al.* Padrões de fonte alimentar dos Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) vetores das Leishmanioses: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. e8567–e8567, 2021. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/8567>. Acesso em: 15 jan. 2024.

TEIXEIRA, M. M. G. *et al.* Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. **Protist**, [s. l.], v. 162, n. 3, p. 503–524, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21420905/>. Acesso em: 15 mar. 2024.

TZINIA, A. K.; SOTERIADOU, K. P. Substrate-dependent pH optima of gp63 purified from seven strains of *Leishmania*. **Molecular and biochemical parasitology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 83–89, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1857388/>. Acesso em: 15 fev. 2024.

VALENTE, M. *et al.* Overview of the role of kinetoplastid surface carbohydrates in infection and host cell invasion: prospects for therapeutic intervention. **Parasitology**, England, v. 146, n. 14, p. 1743–1754, 2019.

VINET, A. F. *et al.* The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of Synaptotagmin V. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 5, n. 10, 2009.

VIOTI, G. *et al.* Xenodiagnosis in four domestic cats naturally infected by *Leishmania infantum*. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 2182–2190, 2022.

WEISE, F. *et al.* Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 113, n. 24, p. 4587–4603, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11082051/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

WHO. Control of the leishmaniases. **World Health Organization technical report series**, Switzerland, n. 949, p. xii–xiii, 1–186, back cover, 2010.

WINBERG, M. E. *et al.* *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 215–222, 2009.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of

Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 132, n. 1, p. 1–16, 2003.

ŽIVANOVIĆ, V. *et al.* Chemical Mapping of *Leishmania* Infection in Live Cells by SERS Microscopy. **Analytical chemistry**, [s. l.], v. 90, n. 13, p. 8154–8161, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29870219/>. Acesso em: 7 mar. 2024.

ANEXO I

ARTIGOS CIENTÍFICOS:

SOUSA, C. J.; BATISTA, J. B.; FIGUEREDO, AMANDA; BARROS, N. C. B., OLIVEIRA, S. S. C.; BRANQUINHA M. H.; CRUZ, M. S. P., MENDONÇA, I. L.; SANTOS, A. L. S. Feline leishmaniasis: treatments and outcomes – challenges to be solved. *Current Medicinal Chemistry*, 2024, in press.

BARROS, N. C. B.; FIGUEREDO, A.; SOUSA, C. J.; SANTOS, A. L. S.; CRUZ, M. S. P. Tratamento da leishmaniose canina no Brasil: uma revisão. *Brazilian Journal of Development*, 2023.

RESUMOS PUBLICADOS

FIGUEREDO, A.; BARROS, N. C. B.; SOUSA, C. J.; SANTOS, A. L. S.; CRUZ, M. S. P. . Standardization of infection in DH82 macrophage cell culture using different isolates of *Leishmania* spp. from naturally infected dogs. In: I LEISH MEIO-NORTE, 2023, Teresina. **I Simpósio Internacional de Leishmanioses da Região Meio-Norte Brasil**, 2023.

SOUSA, C. J.; BATISTA, J. F. ; OLIVEIRA, S. S. C. ; CRUZ, M. S. P. ; MENDONCA, I. L. ; SANTOS, A. L. S. . Detection of gp63-like metalloproteases in *Leishmania infantum* recovered from naturally infected cats from Teresina, Piauí. In: I LEISH MEIO-NORTE, 2023, Teresina - PI. **I Simpósio Internacional de Leishmanioses da Região Meio-Norte Brasil**, 2023.

SOUSA, C. J.. LEVANTAMENTO ENTOMOLÓGICO DE TRIATOMÍNEOS EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO PIAUÍ, BR - REVISÃO DE LITERATURA. In: II Congresso Brasileiro de Parasitologia Humana On-line, 2022, Fortaleza. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, 2022. v. 3.

REVIEW ARTICLE

Feline Leishmaniasis: Evidence-based Treatments and Challenges to be Solved

Caroline de Jesus Sousa^{1,2,3,4}, Joilson Ferreira Batista^{3,5}, Amanda Karoliny Figueredo Brito^{1,4}, Nathália Castelo Branco Barros^{1,4}, Simone Santiago Carvalho de Oliveira², Marta Helena Branquinho², Maria do Socorro Pires e Cruz^{1,4}, Ivete Lopes de Mendonça^{1,3,*} and André Luis Souza dos Santos^{1,2,*}

¹Programa de Pós-Graduação Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; ²Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil; ³Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; ⁴Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; ⁵Secretaria do Trabalho e Desenvolvimento Econômico, Sobral, Ceará, Brasil

Abstract: Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by protozoa parasites from the *Leishmania* genus. Vertebrate hosts acquire the infection through the bite of a female sandfly, initiating a complex parasite development cycle. Contrary to previous beliefs regarding cats' resistance, these animals have recently been identified as potential reservoirs for leishmaniasis. Clinical symptoms in cats can manifest in diverse forms, including cutaneous, mucocutaneous, and visceral manifestations. The diagnosis of feline leishmaniasis is complicated by nonspecific symptoms and the relatively lower specificity of serological tests. The recommended treatment for feline leishmaniasis involves the administration of medications; however, success varies in each cat. This review aims to present cases of feline leishmaniasis, highlighting clinical symptoms, diagnostic methods, therapy schedules, and outcomes. Among the 24 cases documented in the available literature, 12 achieved successful treatment without relapses, resulting in a reduced parasite load and improved symptoms. Three cases responded well but presented persistent sequelae. Two feline leishmaniasis cases initially had treatment success but later experienced recurrences. Finally, no response was observed in seven cases, leading to the euthanasia of cats due to ineffectiveness or irregularities along the therapy. Conventional treatments, despite potential hepatotoxicity and nephrotoxicity, exhibit a high efficacy in reducing parasitic load, thereby improving clinical symptoms and increasing the life expectancy of affected cats. Nevertheless, consistent adherence is crucial, as interruptions may render the therapy ineffective and contribute to parasite resistance. Therefore, addressing the challenges associated with feline leishmaniasis treatment necessitates the development of new strategies to ensure a more effective and sustained approach.

ARTICLE HISTORY

Received: January 23, 2024
Revised: April 01, 2024
Accepted: April 16, 2024

DOI:
10.2174/0109298673305978240527102902

Keywords : *Leishmania*, cats, clinical symptoms, treatment, diagnosis, recommendations.

1. INTRODUCTION

The obligatory intracellular protozoa of the genus *Leishmania*, belonging to the Trypanosomatidae family and Kinetoplastida order, are the etiological agents

of the disease called leishmaniasis [1]. This infection is indeed a neglected tropical disease that is prevalent in more than 90 countries across regions such as Asia, Africa, the Middle East, Central America, the Caribbean, and South America [2]. Geographically, leishmaniasis is classified into two main groups: the "Old World" and the "New World," delineated by the regions where the disease is widespread. The term "Old World" typically refers to the eastern hemisphere, encompassing regions in Africa, Asia, and Europe, while 'New World' pertains to the western hemi-

*Address correspondence to these authors at the Programa de Pós-Graduação Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; E-mails: ivetemendonca54@gmail.com; andre@micro.ufrj.br

sphere, covering the entire American continent. This differentiation is due to the wide diversity of *Leishmania* species causing infections in these distinct geographic areas [3]. Species discrimination is crucial due to the variations among *Leishmania* species in virulence levels and responses to different chemical drugs.

The transmission of *Leishmania* occurs primarily through the bite of female sandflies. These vectors exhibit hematophagous behavior, meaning that they feed on blood to facilitate the development of eggs, while they also feed on plant sugars for flight energy and longevity. During a blood meal, infected female sandflies can transmit the parasites. In the “Old World,” sandflies of the genus *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae) are of significance, while in the “New World,” the genus *Lutzomyia* plays a crucial role in the transmission of *Leishmania*. Both genera of sandflies are medically important in the spread of *Leishmania* parasites and, consequently, open up new opportunities for increasing the number of leishmaniasis cases [4-6]. There are more than 20 zoonotic *Leishmania* species that infect humans, dogs, and cats (Fig. 1). In this context, based on available data in the literature, dogs can be infected by at least 13 *Leishmania* species, while cats have been reported to be infected by at least 6

Leishmania species [7, 8].

Infection occurs when female sandflies transmit metacyclic promastigote forms during a blood meal to a host. These forms then travel to secondary lymphoid organs, infecting host cells of the mononuclear phagocytic system. After an incubation period ranging from a month to several years, amastigote forms emerge and multiply through binary fission within the host cells. This multiplication continues until the infected host cell ruptures, allowing parasites to spread through hematogenous and lymphatic routes. This dissemination often triggers an inflammatory response, attracting other macrophages and perpetuating the infection cycle [9]. The sandfly becomes infected when it ingests amastigote forms contained in the blood during a blood meal from an infected human or animals, such as dogs or cats. Inside the vector's intestine, the amastigotes transform into promastigotes, released into the sandfly's digestive tract. These promastigotes further differentiate into procyclic promastigotes, undergo multiplication through binary division, and then differentiate into metacyclic promastigote forms. These metacyclic forms eventually migrate to the proboscis of the sandfly, restarting the cycle when the sandfly feeds on a new host, transmitting the parasites (Fig. 2) [10, 11].

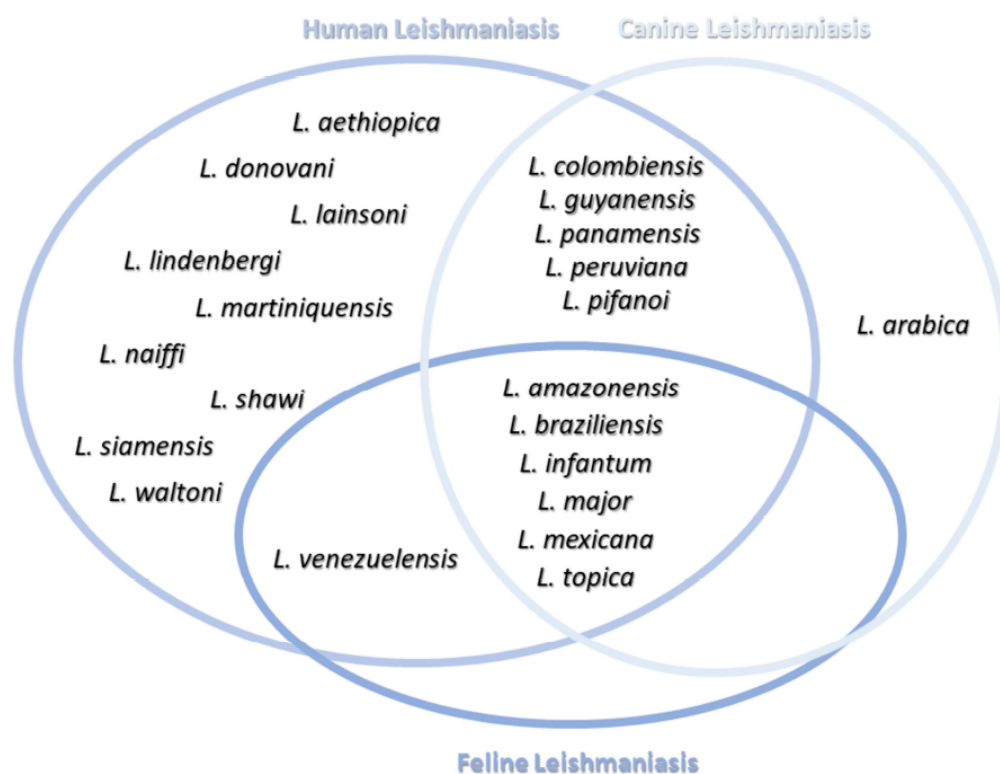


Fig. (1). *Leishmania* species that have been identified as the etiologic agents of human, canine, and feline leishmaniasis. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

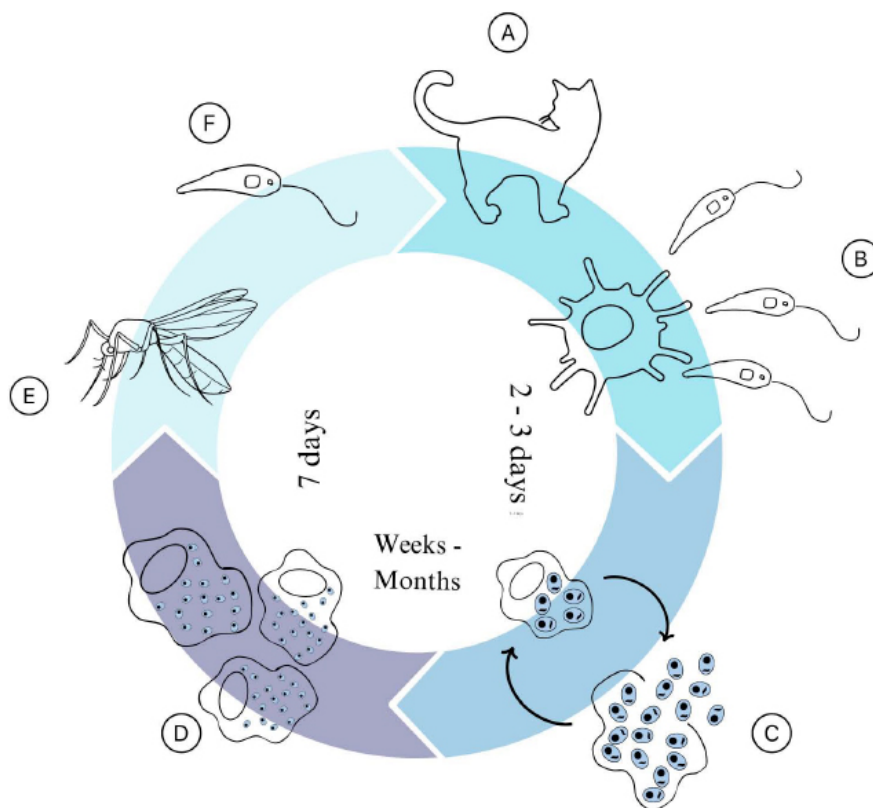


Fig. (2). A representation of the biological and transmission cycle of *Leishmania* in felines. (A) Infected vertebrate host with metacyclic promastigotes after a blood meal. (B) Metacyclic promastigotes infect macrophages, (C) differentiate into amastigotes, proliferate and break up the host cell (D), disseminating the parasites and attracting other macrophages that become infected. (E) Female sandfly, while feeding, ingests amastigote forms present in the blood (F), which differentiate into promastigotes in its digestive tract, migrate to the proboscis, and restart the cycle after a blood meal. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Dogs play a fundamental role in the amplification of the peridomestic cycle of leishmaniasis, being considered the primary reservoirs of *Leishmania* species, including *L. infantum*. Historically, dogs have been recognized as pivotal targets for disease control measures due to their significant contribution to spreading the infection [12]. However, cats have emerged as new reservoirs of the disease despite their status as domestic and synanthropic animals [13]. The recognition of cats as reservoirs is a shift from previous misconceptions that considered felines refractory to *Leishmania* infection. This misunderstanding resulted in the underestimation of *Leishmania* infection in cats. Over the past few decades, an increasing number of reports have revealed a progressive rise in the incidence of *Leishmania* infection in cats, reshaping our understanding of their role in disease transmission and spread [14-17]. This phenomenon can, at least in part, be attributed to three hypotheses: (i) an increase in active investigation of the protozoan in this host, (ii) advancements in diagnostic

techniques, and (iii) the current rise in the prevalence rate of the disease in domestic cats [18]. The first documented feline infection was described in Algeria, where an unidentified *Leishmania* species was discovered. In this case, a four-month-old cat shared a living space with an infected dog and a child, both suffering from visceral forms of the disease. The cat was diagnosed with the presence of the amastigote form of the parasite in the bone marrow [19].

In cats and other symptomatic mammals, leishmaniasis can present various clinical manifestations, which include cutaneous, mucocutaneous, and visceral forms. These manifestations often include nodular, ulcerative, and exfoliative lesions, along with dermatitis on the nose and paws [20, 21], as shown in Fig. (3). Additionally, signs such as stomatitis with oral nodules, ocular manifestations like uveitis and corneal edema, lymphadenopathy, splenomegaly and various hematological abnormalities are suggestive of the disease [22].

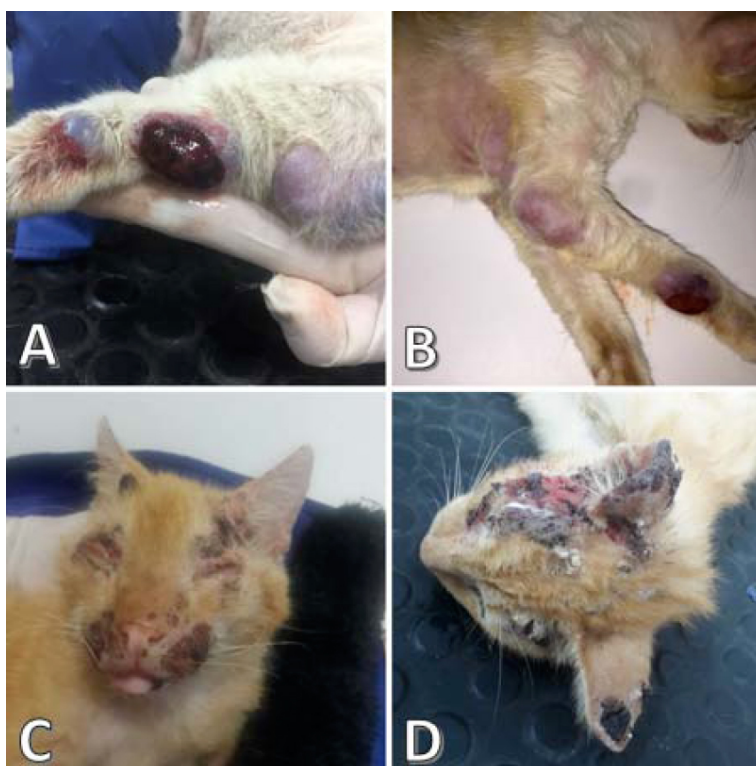


Fig. (3). Nodules and skin lesions in cats infected with *L. infantum*. (A and B), nodules and lesions on the legs. (C and D), lesions involving the face and ears. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

The available data on the therapeutic efficacy of treating feline leishmaniasis remains limited, with only a few cases undergoing thorough investigation. This limitation is partially attributed to the fact that most antileishmanial drugs were initially developed for use in humans and dogs. Furthermore, even in the case of dogs, certain scientifically approved treatment options do not assure a complete cure [23]. It is essential to highlight that the strain of *L. infantum* present in the host plays a crucial role in the clinical manifestation of the disease. This strain variability can influence susceptibility or determine resistance to specific treatments [24].

Based on all these premises, this current perspective review summarizes cases of feline leishmaniasis reported in the available literature, with a focus on clinical symptoms, diagnostic approaches, chemotherapeutic treatments, and outcomes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Search Strategy

At the beginning of September 2023, we conducted a comprehensive review of all available information

published from January 2005 to August 2023. The search, performed using the PubMed database (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), focused on case reports related to the treatment of feline leishmaniasis, employing keywords such as 'Leishmania,' 'leishmaniasis,' 'cat,' 'feline leishmaniasis' and 'treatment.'

2.2. Inclusion and Exclusion Criteria

For the compilation of this perspective review, only articles concerning the treatment of feline leishmaniasis, written in English, were considered relevant. Selected case reports were required to provide comprehensive information, including clinical signs, diagnostic methods, treatment protocols, and post-treatment results for each individual feline. In our analysis, we excluded duplicate records, conference proceedings, experimental studies, books, feline leishmaniasis cases lacking clear treatment and outcome data for each cat, as well as reviews and meta-analyses.

2.3. Data Extraction

The included studies were meticulously cataloged using Microsoft Excel[®], incorporating essential information such as author details, location, and date of the

research (geographic region, country, and year), breed, sex, age, domestic or stray status, clinical presentation, observed signs, clinicopathological alterations, comorbidities, diagnostic methods, treatment administered and outcomes.

3. RESULTS

The PubMed website's search revealed a total of 168 potentially relevant publications. Among these results, 68 described cases of feline leishmaniasis, detailing diagnoses, histopathological, immunohistochemical, and molecular studies, xenodiagnosis, and coinfections. Two publications were not freely accessible, and despite our efforts to contact the authors by e-mail and other social platforms, no response has been received to date. We meticulously reviewed the remaining 166 papers, discovering that only 28 of them documented cases of leishmaniasis in cats with clinical treatment. However, five papers lacked outcomes or complete information for each individual cat. Ultimately, 21 publications met the criteria for inclusion in this review, offering comprehensive information for each treated cat, including details about treatment and outcomes (Fig.

4). In some instances, authors reported more than one clinical case per paper. For example, Pimenta *et al.* [25] documented three cases, and Rüfenacht *et al.* [26] reported two cases, bringing the total number of treated cats to 24.

The feline leishmaniasis cases that underwent complete treatment involved cats with a typical domestic lifestyle. These 21 papers documented feline leishmaniasis occurrences in cats residing in various regions, including Europe (20 cases), North America (1 case), Central America (1 case), South America (1 case), and the Middle East (1 case). The European cases were reported from Portugal (8 cases), Italy (4 cases), Spain (3 cases), Switzerland (3 cases), Greece (1 case) and Germany (1 case). Regarding the *Leishmania* species responsible for these feline leishmaniasis cases, the most frequently identified causal agent was *L. infantum* (14 out of 24 cases; 58.3%), followed by *L. mexicana* (2 cases; 8.3%), *L. amazonensis* (1 case; 4.2%) and *L. donovani* (1 case; 4.2%); however, in six cases (25%), the *Leishmania* species causing the infection was not accurately identified (Table 1).

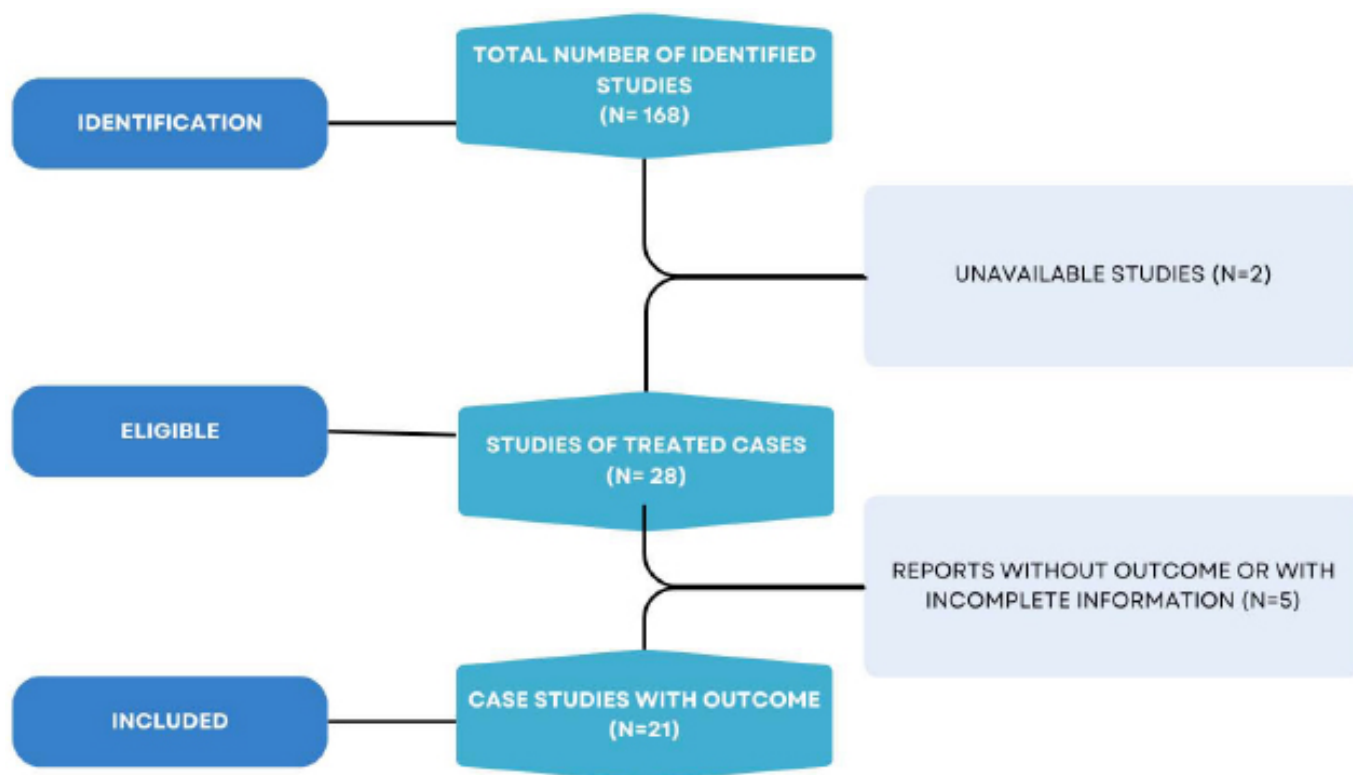


Fig. (4). Flowchart illustrating the results of the database search to find treated cases of feline leishmaniasis. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Table 1. Feline leishmaniasis analyzed in this study.

Continent	Country	Year	N° of cats	Breed	Species (n°)	References
Europe	Portugal	2009	1	DSH	<i>L. infantum</i>	[27]
		2015	3	DSH	<i>L. infantum</i> (2), <i>Leishmania</i> spp (1)	[25]
		2015	1	DSH	<i>L. infantum</i>	[28]
		2016	1	NI	<i>L. infantum</i>	[29]
		2018	1	DSH	<i>L. infantum</i>	[30]
		2019	1	DSH	<i>L. donovani</i>	[31]
	Italy	2015	1	SH	<i>L. infantum</i>	[32]
		2019	1	DSH	<i>L. infantum</i>	[33]
		2022	1	European Shorthair	<i>L. infantum</i>	[34]
		2023	1	DLH	<i>Leishmania</i> spp	[35]
Spain	2005	1	DSH	<i>Leishmania</i> spp	[36]	
	2018	1	DSH	<i>Leishmania</i> spp	[37]	
	2022	1	DSH	<i>Leishmania</i> spp	[38]	
	2005	2	DSH (1) Siamese (1)	<i>Leishmania</i> spp (1), <i>L. infantum</i> (1)	[26]	
Switzerland	2014	1	NI	<i>L. infantum</i>	[39]	
	2022	1	DSH	<i>L. infantum</i>	[40]	
	2023	1	DSH	<i>L. infantum</i>	[41]	
North America	USA	2021	1	DSH	<i>L. mexicana</i>	[42]
Central America	Trinidad & Tobago	2023	1	DSH	<i>L. amazonensis</i>	[43]
South America	Venezuela	2022	1	SH	<i>L. mexicana</i>	[44]
Middle East	Cyprus	2017	1	D	<i>L. infantum</i>	[45]

Abbreviations : D= domestic, DSH= domestic short hair, DLH= domestic long hair, NI= not informed, SH= short hair.

Regarding gender, the studies indicated that among the 24 cats, 10 were males (41.7%), with eight of them being neutered, and in two cases, the neuter status was not reported. Fourteen of the cats were females (58.3%), with seven being spayed, one was not spayed, and in six cases, the spay status was not reported. The ages ranged from 2 to 13 years, with an average age of 9.9 ± 4.5 years. Out of the 24 cats, 18 had short hair (75%), one had long hair (4.2%), one was of the Siamese breed (4.2%), one was of the European Shorthair breed (4.2%), and three cases did not specify the breed (12.4%) (Table 1).

Typically, the diagnosis of leishmaniasis in humans, dogs, and cats involves a combination of clinical, epidemiological, and laboratory examinations. Recommended laboratory tests for diagnosing cutaneous leishmaniasis include parasitological tests (direct collection of material from the lesion), immunological tests (involving antibodies, antigens, or cellular immune response assessments), and molecular tests, such as polymerase chain reaction (PCR), among other diagnostic methods [46, 47].

The diagnosis in the papers compiled for this perspective involved histopathology and cytology of le-

sions, lymph nodes, and bone marrow. The PCR test was conducted in 20 out of 24 cases (83.3%). Among these, 18 yielded positive results: 13 used conventional PCR, 2 used real-time PCR, and 2 authors opted to employ both PCR techniques. It is interesting to note that in the case reported by Richter and colleagues [47], a PCR test was initially performed on a blood sample from the feline, yielding a negative result. Subsequently, after the appearance of nodular lesions, a second sample underwent real-time PCR testing, resulting in a positive outcome. Additionally, the bone marrow sample also tested positive, reinforcing the detection of the agent in question. The presence of specific *Leishmania* antibodies or antigens was examined in 19 out of 24 cats (79.2%) using methods such as immunofluorescence or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

All cats underwent tests to identify immunosuppressive conditions or coexisting diseases, resulting in eight positive cases (33.3%). Some presented one or more concomitant diseases and immunosuppressive conditions. Among these conditions are feline immunodeficiency virus (FIV) in one case, toxoplasmosis in one case, hepatozoonosis in one case, cryptococcosis in one case, FIV and feline leukemia virus (FeLV) in

one case, FeLV in one case, ehrlichiosis and FIV in one case, and diabetes mellitus and FIV in one case (Table 2).

Table 2. Immunosuppressive and/or coexisting diseases in cats with leishmaniasis.

Comorbidities	References
FIV	[25]
Toxoplasmosis	[27]
Hepatozoonosis	[45]
Cryptococcosis	[44]
FeLV and FIV	[34]
FeLV	[31]
Ehrlichiosis and FIV	[41]
Diabetes mellitus and FIV	[35]

Abbreviations: FIV= Feline Immunodeficiency Virus; FeLV= Feline Leukemia Virus

Table 3 summarizes the predominant clinical signs and abnormalities observed in 24 cats infected with *Leishmania*, which include nodular dermatitis (12 cats; 50%), anemia (9 cats; 37.5%), hypergammaglobulinemia (8 cats; 33.3%) and weight loss (7 cats; 29.2%).

Feline leishmaniasis can manifest through nonspecific signs such as depression, reduced appetite, lethargy [27, 41], sneezing [30], vomiting [34], diarrhea [38], rhinitis, nasal discharge [37], and itching [35]. Additionally, reports of atypical cases include vaginal bleeding, absence of anal sphincter reflex [28], inflammation of the inguinal mammary gland [31], and panniculitis [40] (Table 4). On the other hand, the disease can present more characteristic signs such as ulcers, lesions and edema [25, 36], nodules, and crusts on the skin [25, 26, 28, 29, 31, 33, 40-45, 48] (Table 4).

Table 3. Frequency of clinical signs, lesions, and clinicopathological abnormalities detected in cats (n=24) with leishmaniasis.

Clinical signs	Number of cases	Prevalence
Cutaneous		
Subcutaneous abscess	1	0.04
Neoplasm	3	0.12
Infections	2	0.08
Hyperpigmentation	2	0.08
Pyodermatitis	2	0.08
Granular dermatitis	1	0.04
Ulcerative dermatitis	6	0.25
Nodular dermatitis	12	0.50
Alopecia	5	0.20
Scaly dermatitis	1	0.04
Crusted dermatitis	3	0.12
Itch	4	0.16
Systemic		
Sneezing	3	0.12
Respiratory	2	0.08
Reticulocytosis	1	0.04
Hypochromia	1	0.04
Macrocytosis	1	0.04
Thrombocytopenia	8	0.33
Eosinopenia	1	0.04
Leukocytosis	3	0.12
Leukopenia	4	0.16
Monocytosis	3	0.12
Neutrophilia	1	0.04
Neutropenia	1	0.04
Monocytopenia	1	0.04

(Table 3) contd....

Clinical signs	Number of cases	Prevalence
Lymphocytosis	1	0.04
Lymphopenia	1	0.04
Hypergammaglobulinemia	8	0.33
Hyperproteinemia	6	0.25
Hypoalbuminemia	2	0.08
Granulomatous gastroenteritis	1	0.04
Hepatomegaly	3	0.12
Splenomegaly	4	0.16
Azotemia	1	0.04
Blepharospasm	1	0.04
Myelofibrosis	1	0.04
Pulmonary edema	2	0.08
Renomegaly	1	0.04
Anemia	9	0.38
Lymph node enlargement	4	0.16
Dehydration	1	0.04
Weight loss	7	0.29
Dysphagia	1	0.04
Depression	2	0.08
Fever	2	0.08
Lethargy	5	0.20
Pallor	2	0.08
Sensory depletion	1	0.04
Sialorrhea	1	0.04
Vomiting/diarrhea	2	0.08
Diabetes mellitus	1	0.04
Coprostasis	1	0.04
Inflammation of the mammary gland	1	0.04
Vaginal bleeding	1	0.04
Eyepiece		-
Periocular hypotrichosis	1	0.04
Uveitis	5	0.20
Epiphora	1	0.04
Glaucoma	2	0.08
Photophobia	1	0.04
Cataract	1	0.04
Conjunctivitis	3	0.12
Blepharitis	4	0.16
Stromal ulceration	1	0.04
Corneal ulceration	1	0.04
Blepharo spasms	2	0.08
Corneal opacification	3	0.12
Keratitis	1	0.04
Download eyepiece	1	0.04
Panuveitis	2	0.08
Injury in defeat	3	0.12

(Table 3) contd....

Clinical signs	Number of cases	Prevalence
Mucocutaneous		
Stomatitis	4	0.16
Faucitis	1	0.04
Gingivitis	3	0.12
Nasal ulcers	3	0.12
Nasal depigmentation	1	0.04
Oral ulcers	3	0.12
Nasal discharge	3	0.12
Nasal tumor	1	0.04

The treatment of leishmaniasis poses a significant global challenge due to factors such as the limited availability of medications, various and severe side effects, and the emergence of parasite resistance [3]. Systemic therapies for human treatment include pentavalent antimonial compounds (meglumine antimoniate and sodium stibogluconate), amphotericin B (deoxycholate and liposomal formulation), pentamidine, as well as oral therapy with miltefosine (Fig. 5). For clinically simple lesions, recommended therapies include phototherapy or laser therapy, thermotherapy, topical paromomycin and intralesional injections of antimonial compounds [49]. Thermotherapy, increasingly used in South America, has been associated with lesion size reduction and clinical cure [50].

For canine treatment, the recommended initial approach is the use of allopurinol, an effective and relatively safe option when employed as a maintenance medication. Although not officially licensed for use in dogs in the Americas, pentavalent antimonials are often combined with allopurinol in other regions, such as Europe. On the publication date of this article, the United States Food and Drug Administration (FDA) and the Ministry of Agriculture and Livestock (MAPA) of Brazil have not granted a license for the use of glucantime in the treatment of dogs. In countries where glucantime is licensed, the suggested doses are 100 mg/kg administered subcutaneously every 24 hours for 28 days. It is generally used during the first 4 weeks of canine treatment in combination with allopurinol administered as mentioned above. Miltefosine, at 2 mg/kg orally every 24 hours for 28 days, is also typically used during the initial 4 weeks of treatment in combination with allopurinol [51].

In May 2023, the only licensed vaccine for leishmaniasis in Brazil, Leish-Tec[®], faced suspension from manufacturing and sales by MAPA. This suspension ensued after an inspection revealed non-compliance issues with the product, raising concerns about potential

vaccine efficacy. There is currently no projected timeline for the vaccine's return to the market [52]. Furthermore, after a decade of commercialization, CaniLeish[®] (Virbac, Carros, France) was withdrawn from the European market in 2021 [53]. Currently, in Europe, only a licensed vaccine called LetiFend[®] is available. LetiFend[®] (Laboratorios LETI, Spain) was licensed in Europe in February 2016. It is a recombinant vaccine containing a chimeric protein (protein Q) formed by five antigenic fragments from four different proteins of *L. infantum* (ribosomal proteins LiP2a, LiP2b, and LiP0 and histone H2A), with no added adjuvant. The vaccination protocol consists of one vaccine dose, followed by annual boosters, and is recommended for dogs aged six months or older [54].

To date, no scientific evidence has established the most effective treatment for feline leishmaniasis; thus, the current treatment regimen remains empirical. In this context, various treatments were administered to the cats, including the exclusive use of allopurinol in 14 out of 24 cases (58.3%), a combination of allopurinol and *N*-methylglucamine antimoniate in 6 out of 24 cases (25%), and a combination of allopurinol and miltefosine in 1 out of 24 cases (4.2%). Additionally, singular treatments were employed, such as allopurinol with cauterization in 1 case, cryotherapy in 1 cat, and a combination of allopurinol, marbofloxacin, and ArteMin (capsules containing extracts of *Artemisia annua*, which is a medicinal plant) in only one cat. The latter represented an alternative treatment protocol (Table 4). Out of the 24 feline leishmaniasis cases in the literature, 12 (50%) achieved successful treatment without relapses, resulting in a low parasitic load and symptom improvement. Three cases (12.5%) responded well to treatment but had persistent sequelae. Two cases (8.3%) initially had success but then experienced recurrences. Finally, seven cases (29.2%) did not respond to treatment, leading to euthanasia due to the treatment ineffectiveness or irregularities.

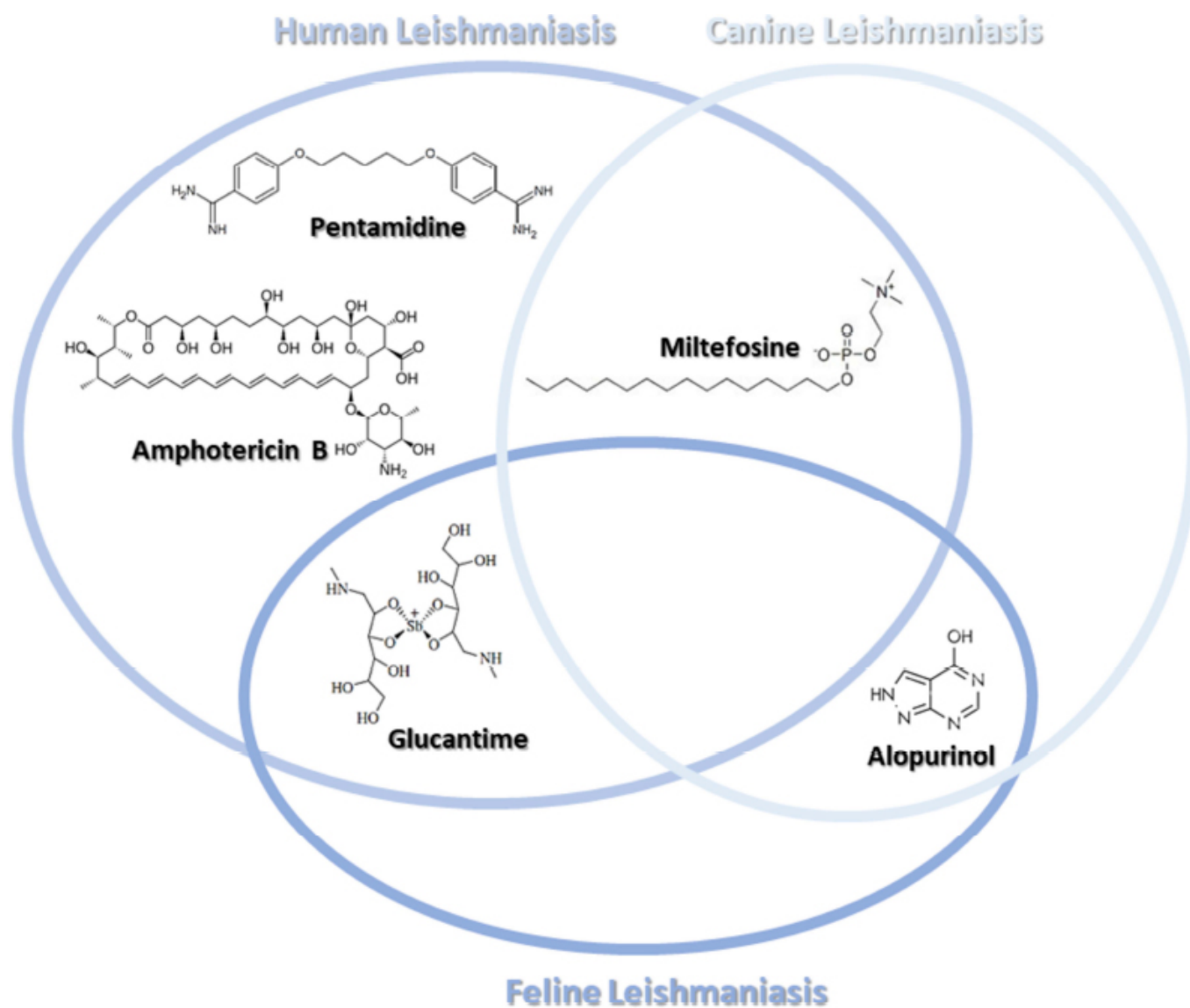


Fig. (5). The main anti-leishmanial agents used in the treatment of humans, canine, and feline leishmaniasis. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Some cases presented adverse effects after starting allopurinol treatment. After one month of therapy, Maia *et al.* [28] reported that allopurinol had to be discontinued due to complications related to coprostitiasis. In another report described by Brianti *et al.* [33], the same treatment caused itching, leading to its discontinuation. Napoli *et al.* [34] also observed side effects after starting allopurinol treatment, including macrocytosis, hypochromia, leukopenia, and significant depletion of platelets. Additionally, Hopke *et al.* [42] achieved clinical success but had to discontinue treatment due to the suspected drug-related neutropenia. Interestingly, after conventional treatment without success, Hopke *et*

al. [42] opted for an alternative approach, prescribing ArteMin capsules. This new alternative protocol proved to be effective, eliciting a positive clinical and cytological response from the patient, and after 8 months, feline leishmaniasis appeared to be controlled. The second case with alternative treatment for cutaneous leishmaniasis was proposed by Mendoza *et al.* [44], who explored an alternative therapy based on localized cryosurgery. This method proved to be an effective, safe, and fast therapeutic alternative for managing feline leishmaniasis, as, due to the known thermosensitivity of *Leishmania* spp., treatment with liquid nitrogen was effective in destroying the parasites [33].

Table 4. Case number, sex, age in years, evaluated clinical signs, diagnosis, comorbidities or diseases, therapy and treatment results.

Case number	Gender, Age (year)	Clinical signs	Diagnosis		Comorbidities	Therapy	Treatment Outcome	Reference
			Quantitative test	Qualitative tests				
1	F, 10	Epiphora, photophobia and corneal ulcer in the right eye	Cytological of the lesion	PCR+ (blood) and ELISA	None	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours), <i>N</i> -methylglucamine antimoniate (50 mg/kg every 12 hours)	Euthanasia 9 months after diagnosis due to kidney failure	[25]
2	F, 8	Localized whitish infiltrate and superficial corneal stromal edema in both eyes	Cytological of the lesion	PCR+ (blood) and ELISA	FIV	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours), <i>N</i> -methylglucamine antimoniate (50 mg/kg every 12 hours)	Good response to treatment, but corneal pigmentation and neovascularization may be observed	[25]
3	F, 9	Lower eyelid injury	Cytological of the lesion	PCR- (blood) and ELISA	None	Allopurinol (10 mg/kg every 24 hours)	One month later, the nodular eyelid lesion completely resolved.	[25]
4	F, 4	Depression and reduced appetite, lethargy, pale mucous membranes, anemia, neutropenia, thrombocytopenia and severe pancytopenia with erythrocyte autoagglutination	Bone marrow cytology	PCR+ (blood), HAI, and electrophoresis	Toxoplasmosis	Blood transfusion, Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours)	Euthanasia 20 days after diagnosis due to worsening condition	[27]
5	F, 8	Chronic proliferative stomatitis and bilateral corneal ulcer	Bone marrow cytology	PCR+ (bone marrow) and ELISA	Diabetes mellitus	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours)	Good response to treatment after 9 months, but therapy was restarted after owners discontinued treatment	[36]
6	M, 6	Ulcerated nodule in the left tarsal region	Bone marrow cytology	PCR+ (Biopsy of the lesion) and ELISA	None	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours), reduced to (5 mg/kg every 12 hours)	Good response to treatment, reduced due to increased plasma activities of liver enzymes. No relapses.	[26]
7	F, 9	Crusts on the tips of the ears and concave side of the ears and neck, and pustules and depigmentation of the nose	Cytology of the lesion and histopathology	PCR+ (Biopsy of the lesion) and ELISA	None	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours)	Good response to treatment, with relapses	[26]

(Table 4) contd....

Case number	Gender, Age (year)	Clinical signs	Diagnosis		Comorbidities	Therapy	Treatment Outcome	Reference
			Quantitative test	Qualitative tests				
8	M, 5	Bad respiratory signs, conjunctivitis and oral lesions	Cytological of the lesion	PCR+ (Aspirates from lymph nodes, swabs, and paraffin blocks from the oral mucosa) and IFAT	None	Allopurinol (20 mg/kg every 12 hours)	Good response to treatment after 6 months of therapy, but slightly underweight	[32]
9	F, 10	Vaginal bleeding, abdominal hematoma, pale mucous membranes, intense pain in the lumbosacral region, absence of anal sphincter reflex and small ulcerated lesion in the right nostril (2 mm)	Cytological of the lesion	PCR+ (Macerated lesions) and IFAT	None	Cauterization of the lesion with silver nitrate, allopurinol (30 mg/kg every 24h), the dose was increased to allopurinol (50 mg/kg every 24h)	Allopurinol was discontinued due to coprostitis. Euthanasia due to ineffective treatment	[28]
10	M, 2	Multiple nodular skin lesions, ulcerative dermatitis on all four limbs, and fever	Cytological of the lesion	qPCR+ (Skin nodules and blood) and IFAT	None	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours), <i>N</i> -methylglucamine antimoniate (50 mg/kg every 24 hours)	Good response to treatment, resulting in small amounts of parasite load	[29]
11	F, 6	Multiple ulcerated skin nodules on the forelimbs	Cytological of the lesion	qPCR+ (Blood and plasma) and ELISA	Hepatozoonosis	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours)	Good response to treatment without relapses	[45]
12	M, 12	Progressively worsening inspiratory effort with concomitant rales and episodic sneezing of several weeks' duration	Lesion cytology and histopathology	PCR+ (Nasal biopsies), electrophoresis and IFAT	None	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours), miltefosine (2 mg/kg every 24 hours)	Allopurinol replaced by miltefosine after a patient had an adverse skin reaction. Good response to treatment but had acute kidney injury.	[30]
13	F, 6	Nodular dermatitis on eyelids and left carpal region, blepharitis, conjunctivitis, ulcerative mucocutaneous lesions in the mouth, and lymph node enlargement	Cytological of the lesion	qRT-PCR+ (Blood and conjunctival smears) and IFAT	None	Allopurinol (20 mg/kg every 24 hours)	Due to irregular administration, there was a progressive worsening, leading to the death of the patient two months after the relapse	[33]

(Table 4) contd....

Case number	Gender, Age (year)	Clinical signs	Diagnosis		Comorbidities	Therapy	Treatment Outcome	Reference
			Quantitative test	Qualitative tests				
14	M, 6	Non-healing itchy sores on the right pinna and right tarsus	Lesion cytology and histopathology	PCR+ (Biopsy of the lesion)	None	Marbofloxacin (3.5 mg/kg every 24h), Allopurinol (15 mg/kg every 24h). ArteMin (50 mg/kg every 12 hours for 11 days), followed by interruption for 3 days, and then restarted for another 11-day cycle	After discontinuation of Marbofloxacin and Allopurinol, there was a good response to treatment with capsules containing Artemisia annua extract, leaving only hypopigmentation and alopecia in the sites of the primary lesion. No relapses.	[42]
15	F, 4	Ulcerated exophytic lesions on the snout	Lesion cytology and histopathology	PCR+ (Biopsy of the lesion)	Cryptococcosis	Cryotherapy with liquid nitrogen	Good response to treatment, no relapses	[44]
16	M, 13	Vomiting episodes	Lymph node cytology	Electrophoresis and IFAT	FIV and FeLV	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours)	Two years after irregular administration and relapses, the owners requested euthanasia.	[34]
17	M, 10	Mild weight loss and small bowel diarrhea	Bone marrow and lymph node cytology	Electrophoresis, IFAT, and DTA	None	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours)	Good response to treatment after 8 months, but died after relapse 3 months later.	[38]
18	F, 7	Chronic uveitis in both eyes	Cytology of the lesion, bone marrow and lymph node	PCR- and qPCR+ (Blood, nodules, and marrow), IFAT- and ELISA	None	Allopurinol (10 mg/kg)	Good response to treatment, no relapses	[39]
19	M, 5	Rhinitis and nasal discharge	Histopathology	None	None	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours)	Good response to treatment resulting in a small amount of parasite load	[37]
20	F, 8	Eyelid nodules in both eyes, bilateral anterior uveitis, and inflammation of the right inguinal mammary gland	lesion cytology	Nested PCR+ (Leukocytic layer and inflammatory mammary fluid)	FeLV	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours), <i>N</i> -methylglucamine antimoniate (50 mg/kg every 24 hours)	Good response to treatment resulting in a small amount of parasite load	[31]

(Table 4) contd....

Case number	Gender, Age (year)	Clinical signs	Diagnosis		Comorbidities	Therapy	Treatment Outcome	Reference
			Quantitative test	Qualitative tests				
21	M, 7	Easy edema and eye injuries	Lesion cytology and histopathology	PCR+ (Blood) and serological	None	Allopurinol (10 mg/kg every 24 hours), <i>N</i> -methylglucamine antimoniato (50 mg/kg every 24 hours)	Good clinical response, but hematological and biochemical abnormalities persisted	[40]
22	F, 6	Lethargy, weight loss, eye discharge, and focal ulcerative lesions on forelimbs	Lesion cytology	qPCR+, PCR+ (Blood, cytobrush), IFAT+ and ELISA+	Ehrlichiosis and FIV	Allopurinol (12.5 mg twice daily), dose increased to 25 mg twice daily	Good response to treatment resulting in a small amount of parasite load	[41]
23	M, 9	Head and neck itching for 2 years	Cytology and histopathology	IFAT	FIV and diabetes mellitus	Allopurinol (10 mg/kg every 12 hours), <i>N</i> -methylglucamine antimoniato (50 mg/kg every 24 hours)	Developed acute kidney injury. Euthanasia after 24 months of treatment due to ineffective treatment	[35]
24	F, 3	Swollen nose and lumps in the ears	Cytology and histopathology	qPCR+, PCR+ (Biopsy of the lesion) and IFAT+	None	Allopurinol (10 mg/kg every 24 hours)	Clinical improvement but with periodic relapses	[43]

Abbreviations: Legend: Case number, sex, age in years, evaluated clinical signs, diagnosis, comorbidities or diseases, therapy and treatment results. Legend: F = female, M = male, PCR = Polymerase Chain Reaction, IFAT = Immunofluorescent Antibody, HI = Indirect Hemagglutination Test, ELISA = Enzyme Immunoassay, FIV = Feline Immunodeficiency Virus, FeLV = feline leukemia virus, DTA = direct agglutination test.

4. DISCUSSION

The clinical symptoms of feline leishmaniasis caused by *L. infantum* typically mirror those observed in canine leishmaniasis. These symptoms encompass lymphadenomegaly, ulcerative skin lesions, crusts, exfoliative or nodular dermatitis, ocular lesions featuring uveitis and conjunctivitis, gingivostomatitis, poor body condition, rhinitis and signs indicative of renal failure. Additionally, clinicopathological alterations such as hyperproteinemia with hypergammaglobulinemia, anemia, proteinuria, and azotemia are common in both canine and feline leishmaniasis [14, 17].

Studies indicate that cats demonstrate an immune response similar to dogs when exposed to *L. infantum*, exhibiting a Th1-type specific immune response. However, available research suggests that, compared to dogs, cats show a less intense humoral immune response with low antibodies titles [55]. Experiments also suggest that cats possess a natural resistance to leishmaniasis and may spontaneously heal lesions [28]. Consequently, cats have the ability to live for many years with a chronic and slowly progressing form of the disease, even in the absence of specific treatment against *Leishmania*. Dogs, on the other hand, exhibit

susceptibility and reduced resistance to canine leishmaniasis, which is influenced by host genetics [56, 57].

Another notable distinction between cat and dog infections by *Leishmania* spp. is the occurrence of coinfections/comorbidities in approximately 50% of cats diagnosed with feline leishmaniasis, including FIV, FeLV, hemotropic *Mycoplasma* infection, malignant neoplasia, endocrine diseases, and treatment with immunosuppressive drugs [14, 17].

Although cats appear to have a higher resistance to *L. infantum* than dogs, the available data suggest that at least the likelihood of infection in these two hosts is similar. This is because it depends on the risk of exposure to sand fly bites, also considering that some vectors have a generalist feeding behavior [58].

Considering the cats' more specific resistance to *Leishmania*, it is crucial to employ more precise diagnostic techniques such as microscopy, culture, and PCR-based assays [59, 60]. These approaches are essential to complement serological results, especially since infected cats often exhibit a low anti-*Leishmania* antibody response or may remain seronegative until approximately the 26th week of infection [61]. Even a PCR analysis from blood can yield negative results, so

additional PCR analyses in lesions, lymph nodes, and bone marrow are advisable [25]. Therefore, a diagnosis based on more than one technique is recommended, as some cats may test positive on PCR and seronegative, or vice versa. This is critical to ensure effective and timely treatment [14].

Regardless of the treatment regimen used for canine visceral leishmaniasis, whether through single-drug or combined-drug therapy, the condition is characterized by high recurrence rates [62]. Achieving clinical and parasitological cure is rarely obtained, and there is the potential for drug resistance, allowing these resistant genes to spread through hybrids between strains and between species generated by recombination in the sand fly vector or through horizontal gene transfer [63-66].

The most commonly used treatment for canine leishmaniasis involves a combination of meglumine antimoniate, aminosidine, or miltefosine with allopurinol, with these options being the only ones licensed in Europe, except for allopurinol. These therapies have demonstrated efficacy in maintaining the parasite load in dogs at reduced levels [67, 68]. In Brazil, the treatment for canine leishmaniasis was authorized in 2016 with the approval of Milteforan® (Virbac Laboratory, Carros, France) [69], marking the end of the previous practice of euthanizing positive dogs [70]. However, miltefosine is not recommended for feline treatment because propylene glycol, an excipient in the licensed oral formulation of miltefosine for canine leishmaniasis, may potentially reduce the lifespan of feline red blood cells due to the formation of Heinz bodies. Therefore, it is preferable to avoid the use of miltefosine in cats until more scientific evidence becomes available [60, 71, 72].

The European Advisory Board on Cat Diseases (ABCD) recommends the long-term administration of allopurinol at doses of 10-20 mg/kg, orally, every 12 or 24 hours, or meglumine antimoniate at doses of 5-50 mg/kg, subcutaneously, every 24 hours for the treatment of feline leishmaniasis [14, 73]. The anti-leishmanial activity of allopurinol was described by Pfaller and Marr [74]. Initially prescribed for the treatment of gout in humans [75], it acts by interfering with the purine pathway and RNA synthesis of the parasite [51]. Allopurinol inhibits the *Leishmania* enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, which is involved in the parasite's purine salvage pathway, converting dephosphorylated purines into monophosphate nucleosides. Thus, phosphorylated allopurinol is likely incorporated into nucleic acids, disrupting protein translation and selectively causing the death of the parasite [76, 77].

Allopurinol in veterinary medicine is considered the primary first-line medication for the long-term treatment of canine leishmaniasis, administered for 6 months to a year or more [70]. Prolonged administration of allopurinol may, however, result in the formation of xanthine crystals in the urinary tract, leading to urolithiasis and possibly contributing to the development of chronic renal failure in long-term therapies for dogs. Similarly, antimonial treatment regimens require careful monitoring of liver and kidney functions due to the potential for hepatotoxicity and nephrotoxicity [14, 35]. Cropstasis has also been observed [28]. It is important to note that although allopurinol therapy has a relatively lower toxicity profile, it has often been associated with disease relapses [43, 78].

The meglumine antimoniate assumes two main models, bivalent Sb(II) and pentavalent Sb(V). The Sb(V) model, which is less toxic, exhibits leishmanicidal activity by forming complexes with ribonucleosides, thus disrupting the function of topoisomerases that are essential for DNA replication and transcription. When Sb(V) is reduced to Sb(II), it interacts with the parasite's biomolecules containing thiol groups, including peptides, proteins, and enzymes. This interaction triggers a cascade of events inducing oxidative stress and culminating in DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis-like death) [79]. Antimony therapy is often accompanied by local pain during intramuscular injections and systemic side effects such as nausea, vomiting, weakness, myalgia, abdominal cramps, diarrhea, skin rashes, and hepatotoxicity, along with cardiotoxicity [80]. Furthermore, meglumine antimoniate is used in human treatment, which is the reason for the current guidelines in South American leishmaniasis control programs that prohibit its administration in dogs [81]. On the other hand, in regions like Europe, meglumine antimoniate is still used to treat dog leishmaniasis [51].

It is crucial for pet owners to diligently follow the guidance of veterinary healthcare professionals, administering the medication at the correct time and dosage without interruptions. Discontinuation may contribute to the development of parasite drug resistance, and in severe cases, it may result in the death of the animal. In the event of any interruptions, promptly informing the professional is essential for them to make the best decisions for the animal. Adherence to these guidelines enhances the animal's chances of success in treatment, leading to a significant reduction in parasite load and improvement in its clinical condition. Therefore, the active collaboration of pet owners plays a crucial role in the treatment and effective recovery of animals affected by leishmaniasis.

The treatment of feline leishmaniasis is a significant challenge, involving the search for a medication that meets multiple essential criteria. This medication must (i) be specific to feline leishmaniasis, not used in the treatment of human leishmaniasis, (ii) not cause renal damage or any other adverse effects in the cat, (iii) ensure effective control of the parasitic load in the cat's body, and (iv) block the transmission of the parasite between hosts.

Based on current knowledge, cats are considered secondary reservoirs of *L. amazonensis* [82], *L. infantum* [15], *L. major* [83], *L. mexicana* [84], *L. tropica* [85], *L. venezuelensis* [86] and *L. braziliensis* [16]. However, their ability to sustain a persistent infection in a natural environment is limited in the absence of a primary reservoir, such as dogs. In summary, cats alone would not be able to maintain *Leishmania* infection in areas where disease transmission is possible, even in the presence of competent vectors like sandflies [87].

It is relevant to highlight that, despite cats being considered secondary reservoirs, a deeper understanding of their epidemiological role in the maintenance and transmission of leishmaniasis requires further investigation. Conversely, it has been found that *L. infantum* has been isolated in fleas, ticks, and other arthropods, suggesting that these arthropods may also play a crucial role in transmission, including in cats [88]. Studies conducted by Vioti *et al.* [89] indicated, through *in vivo* experiments, that infected cats have the ability to transmit *L. infantum* to sandflies. Studies on vector-borne diseases in dogs and cats from the Aeolian Islands (Sicily, southern Italy), an endemic area for *L. infantum*, reported a prevalence of 26% and 42% in dogs and cats, respectively, by serological and molecular methods [90].

As a preventive measure and to reduce the need for systemic antimonial drugs with adverse effects, Basso *et al.* [29] suggest exploring new insecticides to prevent sandfly bites in cats. It is important to note that all currently registered insecticides for sand fly control contain permethrin, a substance highly toxic to cats. Therefore, the search for safe and effective alternatives becomes essential for feline health protection. As a systemic insecticide, a precise formulation of fluralaner, ranging from 112.5 to 500 mg, has been authorized for the control of ectoparasites such as ticks, fleas, and mites in cats. This insecticide has demonstrated efficacy in inducing long-term mortality in *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus perniciosus*, vectors of *L. infantum* in the “New World” and “Old World,” respec-

tively, after feeding on treated dogs [91, 92]. Similar results are expected to be observed in cats. On the other hand, chemoprophylaxis can be effectively achieved by using a collar impregnated with a matrix containing 10% imidacloprid and 4.5% flumethrin. This formulation, as evidenced by studies such as Brianti *et al.* [93], has proven safe and effective in significantly reducing the risk of *L. infantum* infection in cats.

Ensuring cats remain indoors from dusk until dawn, particularly during the active period of sandfly vectors [94], and implementing physical barriers such as nets with a mesh of 1,240 holes per square inch on windows and doors [95], are effective strategies for preventing exposure to sandfly bites. These proactive measures not only safeguard against direct contact with sandflies but also significantly reduce the overall risk of *Leishmania* infection.

It is also important to emphasize that, in the absence of evidence suggesting otherwise, it is advisable to avoid using cats infected with *Leishmania* for breeding purposes or as blood donors. This precaution is crucial due to the potential risk of transmitting the parasites through blood transfusion and *via* venereal or congenital routes, as documented in dogs [96, 97].

CONCLUSION

So far, few studies have been conducted regarding the optimal treatment for feline leishmaniasis; however, new reports are being described. Conventional treatments, even though they can be hepato- and nephrotoxic if correctly administered, have a high chance of reducing the parasitic load. More studies need to be conducted to assess the effectiveness of alternative treatments and management of feline leishmaniasis. This will help to determine the ideal technique and time intervals between procedures, which are crucial for enhancing treatment outcomes and minimizing the risk of treatment failure. Ultimately, this contributes to the overall well-being of affected feline populations. Discussing the dissemination of feline leishmaniasis is of great importance, as it is not well understood, and there may be significant differences in disease development compared to dogs.

Finally, the authors propose this review to shed light on the significant issue of feline leishmaniasis, which remains neglected and riddled with gaps that need addressing by researchers worldwide. Our goal is to mobilize the international scientific community to tackle this widespread problem. In this context, the authors encourage clinicians to publish their therapeutic

protocols to foster a broad discussion about this topic and enable testing across different regions. Furthermore, the authors aim to inspire researchers to discover new potent compounds for future use in the clinical veterinary arena. We anticipate that this review will serve as a catalyst for further research in this neglected field and stimulate constructive dialogue on effective strategies to combat feline leishmaniasis.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the study's conception and design. Data collection and analysis were performed by Caroline Sousa and André Santos. The first draft of the manuscript was written by Caroline Sousa and André Santos, and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

LIST OF ABBREVIATIONS

DSH	= Domestic Short Hair
DLH	= Domestic Long Hair
SH	= Short Hair
PCR	= Polymerase Chain Reaction
IFAT	= Immunofluorescent Antibody
HI	= Indirect Hemagglutination Test
ELISA	= Enzyme Immunoassay
FIV	= Feline Immunodeficiency Virus
FeLV	= Feline Leukemia Virus
DTA	= Direct Agglutination Test.
RNA	= Ribonucleic Acid
DNA	= Ácido Desoxirribonucleico
ABCD	= European Advisory Board on Cat Diseases
FDA	= United States Food and Drug Administration
MAPA	= Ministry of Agriculture and Livestock from Brazil

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

This work was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI), Conselho Na-

cional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Financial code 001).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- [1] Solano-Gallego, L.; Baneth, G. Feline leishmaniosis. *Infectious diseases of the dog and cat*, **2006**, 748-749.
- [2] CDC Epidemiology and risk factors. **2020**. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html> (accessed 23 December 2023).
- [3] Mann, S.; Frasca, K.; Scherrer, S.; Henao-Martínez, A.F.; Newman, S.; Ramanan, P.; Suarez, J.A. A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. *Curr. Trop. Med. Rep.*, **2021**, 8(2), 121-132. <http://dx.doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7> PMID: 33747716
- [4] Lane, R. P. *Medical insects and arachnids*; Springer, **2012**.
- [5] Dostálová, A.; Volf, P. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasit. Vectors*, **2012**, 5(1), 276. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-276> PMID: 23206339
- [6] Simões-Mattos, L.; Bevilaqua, C.; Mattos, M.R.F.; Pompeu, M. Feline leishmaniasis: Uncommon or unknown? *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, **2004**, 99, 79-87. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90403-0](http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(94)90403-0)
- [7] Dantas-Torres, F.; Solano-Gallego, L.; Baneth, G.; Ribeiro, V.M.; de Paiva-Cavalcanti, M.; Otranto, D. Canine leishmaniosis in the old and new worlds: Unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.*, **2012**, 28(12), 531-538. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007> PMID: 22995719
- [8] Paşa, S.; Tetik Vardarlı, A.; Erol, N.; Karakuş, M.; Töz, S.; Atasoy, A.; Balcıoğlu, İ.C.; Emek Tuna, G.; Ermiş, Ö.V.; Ertabaklar, H.; Özbek, Y. Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. *Vet. Parasitol.*, **2015**, 212(3-4), 389-392. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.042> PMID: 26277567
- [9] *Pan American Health Organization. Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas*; PAHO: Washington, D.C., **2019**.
- [10] Sasidharan, S.; Saudagar, P. Leishmaniasis: Where are we and where are we heading? *Parasitol. Res.*, **2021**, 120(5), 1541-1554. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-021-07139-2> PMID: 33825036
- [11] Higgins, A.; Flynn, A.; Marconnet, A.; Musgrove, L.; Postis, V.; Lippiat, J.; Chung, C.; Ceska, T.; Zoonens, M.; Sobott, F.; Muench, S. Cycloalkane-modified amphiphilic polymers provide direct extraction of membrane proteins for CryoEM analysis. *Commun. Biol.*, **2021**, 5, 42003. <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-021-02834-3>

- [12] Nascimento, L.F.J.; Cirilo, T.M.; Gomes, D.S.; Gomes, A.C.A.; Lima, V.F.S.; Scher, R.; Jain, S.; Fujiwara, R.T.; Dolabella, S.S. Epidemiological and diagnostic aspects of feline leishmaniasis with emphasis on Brazil: A narrative review. *Parasitol. Res.*, **2022**, *121*(1), 21-34. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-021-07372-9> PMID: 34761278
- [13] Dantas-Torres, F.; Brandão-Filho, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **2006**, *48*(3), 151-156. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652006000300007> PMID: 16847505
- [14] Pennisi, M. G. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniasis. *Parasit. Vectors*, **2015**, *8*, 302. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0909-z>
- [15] Baneth, G.; Nachum-Biala, Y.; Zuberi, A.; Zipori-Barki, N.; Orshan, L.; Kleinerman, G.; Shmueli-Goldin, A.; Bellaiche, M.; Leszkowicz-Mazuz, M.; Salant, H.; Yasur-Landau, D. *Leishmania* infection in cats and dogs housed together in an animal shelter reveals a higher parasite load in infected dogs despite a greater seroprevalence among cats. *Parasit. Vectors*, **2020**, *13*(1), 115. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-020-3989-3> PMID: 32192533
- [16] Costa-Val, A.P.; Coura, F.M.; Barbieri, J.M.; Diniz, L.; Sampaio, A.; Reis, J.K.P.; Bueno, B.L.; Gontijo, C.M.F. Serological study of feline leishmaniasis and molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in cats (*Felis catus*). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **2020**, *29*(2), e003520. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612020023>
- [17] Fernandez-Gallego, A.; Feo Bernabe, L.; Dalmau, A.; Esteban-Saltiveri, D.; Font, A.; Leiva, M.; Ortuñez-Navarro, A.; Peña, M.T.; Tabar, M.D.; Real-Sampietro, L.; Saló, F.; Lloret, A.; Bardagi, M. Feline leishmaniasis: Diagnosis, treatment and outcome in 16 cats. *J. Feline Med. Surg.*, **2020**, *22*(10), 993-1007. <http://dx.doi.org/10.1177/1098612X20902865> PMID: 32053024
- [18] Silveira Neto, L.D.; Marcondes, M.; Bilslund, E.; Matos, L.V.S.; Viol, M.A.; Bresciani, K.D.S. Clinical and epidemiological aspects of feline leishmaniasis in Brazil. *Semin. Cienc. Agrar.*, **2015**, *36*(3), 1467-1480. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n3p1467>
- [19] Sergeant, E.; Sergeant, E.; Lombard, J.; Quilichini, M. Simultaneous infection of a child, a dog and a cat in the same home. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **1912**, *5*, 93-98.
- [20] Abramo, F.; Albanese, F.; Gattuso, S.; Randone, A.; Filecchia, I.; Dedola, C.; Ibba, F.; Ottaiano, P.; Brianti, E. Skin lesions in feline leishmaniasis: A systematic review. *Pathogens*, **2021**, *10*(4), 472. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10040472> PMID: 33924616
- [21] Batista, J.F.; Magalhães Neto, F.C.R.; Lopes, K.S.P.P.; Sousa, C.M.G.; Alcântara, D.S.; Baêta, S.A.F.; Alves, M.M.M.; Mendonça, I.L. Clinical, hematological, biochemical, and histopathological evaluations in domestic cats (*Felis catus*) infected by *Leishmania infantum*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **2023**, *32*(3), e004723. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612023037> PMID: 37436206
- [22] Paniz Mondolfi, A.E.; Colmenares Garmendia, A.; Mendoza Pérez, Y.; Hernández-Pereira, C.E.; Medina, C.; Vargas, F.; Sandoval, D.; Agüero, J.; Román, D.; Forlano-Riera, M.; Salas, Y.; Peraza, M.; Romero, P.; Aldana, F.; Castillo, T.; Santeliz, S.; Perez, G.; Suarez-Alvarado, M.J.; Morales-Panza, R.J.; Kato, H. Autochthonous cutaneous leishmaniasis in urban domestic animals (*Felis catus* / *Canis lupus familiaris*) from central-western Venezuela. *Acta Trop.*, **2019**, *191*, 252-260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.006> PMID: 30633896
- [23] Greene, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. *Aust. Vet. J.*, **1999**, *77*(3), 194-194. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.1999.tb11241.x>
- [24] Ait-Oudhia, K.; Gazanion, E.; Sereno, D.; Oury, B.; Dedet, J.P.; Pralong, F.; Lachaud, L. *In vitro* susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Vet. Parasitol.*, **2012**, *187*(3-4), 386-393. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.034> PMID: 22349936
- [25] Pimenta, P.; Alves-Pimenta, S.; Barros, J.; Barbosa, P.; Rodrigues, A.; Pereira, M.J.; Maltez, L.; Gama, A.; Cristóvão, J.M.; Campino, L.; Maia, C.; Cardoso, L. Feline leishmaniasis in Portugal: 3 cases (year 2014). *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.*, **2015**, *1-2*, 65-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.02.003> PMID: 31018412
- [26] Rüfenacht, S.; Sager, H.; Müller, N.; Schaefer, V.; Heier, A.; Welle, M.M.; Roosje, P.J. Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland. *Vet. Rec.*, **2005**, *156*(17), 542-545. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.156.17.542> PMID: 15849344
- [27] Marcos, R.; Santos, M.; Malhão, F.; Pereira, R.; Fernandes, A.C.; Montenegro, L.; Roccabianca, P. Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. *Vet. Clin. Pathol.*, **2009**, *38*(2), 201-205. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00111.x> PMID: 19490573
- [28] Maia, C.; Sousa, C.; Ramos, C.; Cristóvão, J. M.; Faisca, P.; Campino, L. First case of feline leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* genotype E in a cat with a concurrent nasal squamous cell carcinoma. *JFMS Open Rep.*, **2015**, *1*(2), 2055116915593969. <http://dx.doi.org/10.1177/2055116915593969>
- [29] Basso, M.; Marques, C.; Santos, M.; Duarte, A.; Pissarra, H.; Carreira, L. M.; Gomes, L.; Valério-Bolas, A.; Tavares, L.; Santos-Gomes, G.; da Fonseca, I. Successful treatment of feline leishmaniasis using a combination of allopurinol and N-methyl-glucamine antimoniate. *JFMS Open Rep.*, **2016**, *2*(1), 2055116916630002. <http://dx.doi.org/10.1177/2055116916630002>
- [30] Leal, R. O.; Pereira, H.; Cartaxeiro, C.; Delgado, E.; Peleteiro, M. C.; Fonseca, I. P. Granulomatous rhinitis secondary to feline leishmaniasis: Report of an unusual presentation and therapeutic complications. *JFMS Open Rep.*, **2018**, *4*(2), 2055116918811374. <http://dx.doi.org/10.1177/2055116918811374>
- [31] Pereira, A.; Valente, J.; Parreira, R.; Cristóvão, J.M.; Azinheira, S.; Campino, L.; Maia, C. An unusual case of feline leishmaniasis with involvement of the mammary glands. *Top. Companion Anim. Med.*, **2019**, *37*, 100356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcam.2019.100356> PMID: 31837752
- [32] Migliazzo, A.; Vitale, F.; Calderone, S.; Puleio, R.; Binanti, D.; Abramo, F. Feline leishmaniasis: A case with a high parasitic burden. *Vet. Dermatol.*, **2015**, *26*(1), 69-70. <http://dx.doi.org/10.1111/vde.12180> PMID: 25327399

- [33] Brianti, E.; Celi, N.; Napoli, E.; Abbate, J.M.; Arfuso, F.; Gaglio, G.; Iatta, R.; Giannetto, S.; Gramiccia, M.; Otranto, D. Treatment and long-term follow-up of a cat with leishmaniosis. *Parasit. Vectors*, **2019**, *12*(1), 121. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3388-9> PMID: 30909954
- [34] Napoli, E.; De Benedetto, G.; Fazio, C.; La Russa, F.; Gaglio, G.; Brianti, E. Clinical case of feline leishmaniosis: Therapeutic approach and long-term follow-up. *Vet. Sci.*, **2022**, *9*(8), 400. <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci9080400> PMID: 36006315
- [35] Tiozzo, A.A.; Masserdotti, C.; Becattini, L.; Ottaiano, P.; Ferrari, F.; Tamborini, A. Long-term follow-up of a case of feline leishmaniosis treated with a combination of allopurinol and meglumine antimoniate. *Can. Vet. J.*, **2023**, *64*(3), 239-244. PMID: 36874537
- [36] Leiva, M.; Lloret, A.; Peña, T.; Roura, X. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Vet. Ophthalmol.*, **2005**, *8*(1), 71-75. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.00342.x> PMID: 15644104
- [37] Altuzarra, R.; Movilla, R.; Roura, X.; Espada, Y.; Majo, N.; Novellas, R. Computed tomographic features of destructive granulomatous rhinitis with intracranial extension secondary to leishmaniasis in a cat. *Vet. Radiol. Ultrasound*, **2020**, *61*(6), E64-E68. <http://dx.doi.org/10.1111/vru.12666> PMID: 29998611
- [38] Tabar, M.D.; Naranjo, C.; Dehesa, A.; Rodriguez, M.C. Leishmaniosis in a cat with chronic diarrhea as the only clinical manifestation. *J. Vet. Intern. Med.*, **2022**, *36*(2), 753-757. <http://dx.doi.org/10.1111/jvim.16347> PMID: 35037701
- [39] Matralis, D.; Papadogiannaki, I.; Gkerdidani, E.; Patsoula, E.; Tegos, N.; Papadogiannakis, E. A case of feline leishmaniosis with panniculitis. *Case Rep. Vet. Med.*, **2023**, *2023*, 1-4. <http://dx.doi.org/10.1155/2023/8864790> PMID: 36685018
- [40] Schäfer, I.; Schmidt, A.; Gräber, F.; Schieszler, A.; Aupperle-Lellbach, H.; Loesenbeck, G.; Gentil, M.; Müller, E.; Naucke, T.J. Feline leishmaniosis with focus on ocular manifestation: A case report. *Parasit. Vectors*, **2023**, *16*(1), 161. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-023-05741-0> PMID: 37173777
- [41] Hopke, K.; Meyers, A.; Auckland, L.; Hamer, S.; Florin, D.; Diesel, A.; Patterson, A. Leishmania mexicana in a central Texas cat: Clinical presentation, molecular identification, sandfly vector collection and novel management. *JFMS Open Rep.*, **2021**, *7*(1), 2055116921999595. <http://dx.doi.org/10.1177/2055116921999595>
- [42] Pargass, I.; Wint, C.; Suepaul, R.; Frontera-Acevedo, K.; Quorollo, B.A. First reported case of leishmaniasis in a cat in Trinidad and Tobago. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.*, **2023**, *42*, 100896. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100896> PMID: 37321792
- [43] Mendoza, Y.; Colmenares, A.; Hernández-Pereira, C.E.; Shaban, M.V.; Mogollón, A.; Morales-Panza, R.J.; Suarez-Alvarado, M.J.; Sordillo, E.M.; Kato, H.; Paniz-Mondolfi, A.E. Cutaneous leishmaniosis due to *Leishmania mexicana* in a cat treated with cryotherapy. *Vet. Dermatol.*, **2022**, *33*(5), 450-453. <http://dx.doi.org/10.1111/vde.13083> PMID: 35644532
- [44] Attipa, C.; Neofytou, K.; Yiapanis, C.; Martínez-Orellana, P.; Baneth, G.; Nachum-Biala, Y.; Brooks-Brownlie, H.; Solano-Gallego, L.; Tasker, S. Follow-up monitoring in a cat with leishmaniosis and coinfections with *Hepatozoon felis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’. *J. Feline Med. Surg. Open Rep.*, **2017**, *3*(2) <http://dx.doi.org/10.1177/2055116917740454> PMID: 29163980
- [45] Solano-Gallego, L.; Koutinas, A.; Miró, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M.G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, **2009**, *165*(1-2), 1-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022> PMID: 19559536
- [46] Thakur, S.; Joshi, J.; Kaur, S. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J. Parasit. Dis.*, **2020**, *44*(2), 253-272. <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w> PMID: 32419743
- [47] Richter, M.; Schaarschmidt-Kiener, D.; Krudewig, C. Ocular signs, diagnosis and long-term treatment with allopurinol in a cat with leishmaniasis. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, **2014**, *156*(6), 289-294. <http://dx.doi.org/10.1024/0036-7281/a000593> PMID: 24867242
- [48] Rocha, A.V.V.O.; Moreno, B.F.S.; Cabral, A.D.; Louzeiro, N.M.; Miranda, L.M.; Santos, V.M.B.; Costa, F.B.; Nogueira, R.M.S.; Marcili, A.; Sperança, M.A.; Costa, A.P. Diagnosis and epidemiology of *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil. *Vet. Parasitol.*, **2019**, *273*, 80-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.007> PMID: 31446257
- [49] Aronson, N.; Herwaldt, B.L.; Libman, M.; Pearson, R.; Lopez-Velez, R.; Weina, P.; Carvalho, E.M.; Ephros, M.; Jeronimo, S.; Magill, A. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america (IDSA) and the american society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). *Clin. Infect. Dis.*, **2016**, *63*(12), e202-e264. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciw670> PMID: 27941151
- [50] Gonçalves, S.V.C.B.; Costa, C.H.N. Treatment of cutaneous leishmaniasis with chemotherapy in Brazil: An efficacy and safety study. *An. Bras. Dermatol.*, **2018**, *93*(3), 347-355. <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20186415> PMID: 29924242
- [51] Baneth, G.; Solano-Gallego, L. Leishmaniasis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **2022**, *52*(6), 1359-1375. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.06.012> PMID: 36336425
- [52] MAP. Mapa suspends manufacturing and sale and orders the recall of batches of vaccine against Leishmaniasis. Available from: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contr-leishmaniose-apos-fiscalizacao> (Accessed December 29, 2023).
- [53] Baxarias, M.; Homedes, J.; Mateu, C.; Attipa, C.; Solano-Gallego, L. Use of preventive measures and serological screening tools for *Leishmania infantum* infection in dogs from Europe. *Parasit. Vectors*, **2022**, *15*(1), 134. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-022-05251-5>
- [54] Fernández Cotrina, J.; Iniesta, V.; Monroy, I.; Baz, V.; Hugnet, C.; Marañón, F.; Fabra, M.; Gómez-Nieto, L.C.; Alonso, C. A large-scale field randomized trial demons-

- trates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. *Vaccine*, **2018**, *36*(15), 1972-1982. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.111> PMID: 29525281
- [55] Berman, J.D.; Neva, F.A. Effect of temperature on multiplication of *Leishmania* amastigotes within human monocyte-derived macrophages *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1981**, *30*(2), 318-321. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.318> PMID: 7235124
- [56] Miranda, S.; Roura, X.; Picado, A.; Ferrer, L.; Ramis, A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Res. Vet. Sci.*, **2008**, *85*(1), 35-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.09.003> PMID: 17942128
- [57] Gharbi, M.; Jaouadi, K.; Mezghani, D.; Darghouth, M.A. Symptoms of canine leishmaniosis in tunisian dogs. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **2018**, *111*(1), 51-55. <http://dx.doi.org/10.3166/bspe-2018-0017> PMID: 30763509
- [58] Maroli, M.; Feliciangeli, M.D.; Bichaud, L.; Charrel, R.N.; Gradoni, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.*, **2013**, *27*(2), 123-147. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x> PMID: 22924419
- [59] Oliva, G.; Scalone, A.; Foglia Manzillo, V.; Gramiccia, M.; Pagano, A.; Di Muccio, T.; Gradoni, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.*, **2006**, *44*(4), 1318-1322. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.4.1318-1322.2006> PMID: 16597857
- [60] Pennisi, M.G.; Persichetti, M.F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Vet. Parasitol.*, **2018**, *251*, 131-137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.012> PMID: 29426470
- [61] Simões-Mattos, L.; Mattos, M.R.F.; Teixeira, M.J.; Oliveira-Lima, J.W.; Bevilacqua, C.M.L.; Prata-Júnior, R.C.; Holanda, C.M.; Rondon, F.C.M.; Bastos, K.M.S.; Coêlho, Z.C.B.; Coêlho, I.C.B.; Barral, A.; Pompeu, M.M.L. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Vet. Parasitol.*, **2005**, *127*(3-4), 199-208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.008> PMID: 15710520
- [62] Ribeiro, R.R.; Michalick, M.S.M.; da Silva, M.E.; dos Santos, C.C.P.; Frézard, F.J.G.; da Silva, S.M.; Frézard, G.; Magno, S. Canine leishmaniasis: An overview of the current status and strategies for control. *BioMed Res. Int.*, **2018**, *2018*(29), 1-12. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/3296893> PMID: 29789784
- [63] Yasur-Landau, D.; Jaffe, C. L.; David, L.; Baneth, G. Allopurinol resistance in leishmania infantum from dogs with disease relapse. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, **2016**, *10*(1), e0004341.
- [64] Marcondes, M.; Day, M.J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Res. Vet. Sci.*, **2019**, *123*, 261-272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022> PMID: 30708238
- [65] Akopyants, N. S.; Kimblin, N.; Secundino, N.; Patrick, R.; Peters, N.; Lawyer, P.; Dobson, D. E.; Beverley, S. M.; Sacks, D. L. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, **2009**, *324*, 265-268. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1169464>
- [66] Douanne, N.; Dong, G.; Amin, A.; Bernardo, L.; Blanchette, M.; Langlais, D.; Olivier, M.; Fernandez-Prada, C. *Leishmania* parasites exchange drug-resistance genes through extracellular vesicles. *Cell. Rep.*, **2022**, *40*(3), 111121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111121>
- [67] Solano-Gallego, L.; Miró, G.; Koutinas, A.; Cardoso, L.; Pennisi, M.G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors*, **2011**, *4*(1), 86. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-4-86> PMID: 21599936
- [68] Gizzarelli, M.; Foglia Manzillo, V.; Inglese, A.; Montagnaro, S.; Oliva, G. Retrospective long-term evaluation of miltefosine-allopurinol treatment in canine leishmaniosis. *Pathogens*, **2023**, *12*(7), 864. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens12070864> PMID: 37513711
- [69] Da Agricultura, M. Ministry of agriculture, livestock and supply veterinary products inspection coordination-Dfip-Sda-Cpv. *Not. Téc.*, **2016**, *11*, 19-20.
- [70] Vaz, T.P.; Quaresma, P.F.; Rêgo, F.D.; Souza, C.B.; Fontes, G.; Gontijo, C.M.F. Clinical and laboratory response of domiciled dogs with visceral leishmaniasis treated with miltefosine and allopurinol. *Trop. Med. Infect. Dis.*, **2023**, *8*(10), 472. <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed8100472> PMID: 37888600
- [71] Christopher, M.M.; White, J.G.; Eaton, J.W. Erythrocyte pathology and mechanisms of Heinz body-mediated hemolysis in cats. *Vet. Pathol.*, **1990**, *27*(5), 299-310. <http://dx.doi.org/10.1177/030098589002700501> PMID: 2238384
- [72] Garcia-Torres, M.; López, M.C.; Tasker, S.; Lappin, M.R.; Blasi-Brugué, C.; Roura, X. Review and statistical analysis of clinical management of feline leishmaniosis caused by *Leishmania infantum*. *Parasit. Vectors*, **2022**, *15*(1), 253. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-022-05369-6>
- [73] Pennisi, M.G.; Hartmann, K.; Lloret, A.; Addie, D.; Belák, S.; Boucraut-Baralon, C.; Egberink, H.; Frymus, T.; Gruffydd-Jones, T.; Hosie, M.J.; Lutz, H.; Marsilio, F.; Möstl, K.; Radford, A.D.; Thiry, E.; Truyen, U.; Horzinek, M.C. Leishmaniosis in cats. *J. Feline Med. Surg.*, **2013**, *15*(7), 638-642. <http://dx.doi.org/10.1177/1098612X13489229> PMID: 23813831
- [74] Pfaller, M.A.; Marr, J.J. Antileishmanial effect of allopurinol. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1974**, *5*(5), 469-472. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.5.5.469> PMID: 4462464
- [75] Sivera, F.; Andrés, M.; Carmona, L.; Kydd, A.S.R.; Moi, J.; Seth, R.; Sriranganathan, M.; van Durme, C.; van Echteld, I.; Vinik, O.; Wechalekar, M.D.; Aletaha, D.; Bombardier, C.; Buchbinder, R.; Edwards, C.J.; Landewé, R.B.; Bijlsma, J.W.; Branco, J.C.; Burgos-Vargas, R.; Catrina, A.I.; Elewaut, D.; Ferrari, A.J.L.; Kiely, P.; Leeb, B.F.; Montecucco, C.; Müller-Ladner, U.; Østergaard, M.; Zochling, J.; Falzon, L.; van der Heijde, D.M. Multinational evidence-based recommendations for the diagnosis and management of gout: Integrating systematic literature review and expert opinion of a broad panel of rheumatolo-

- gists in the 3e initiative. *Ann. Rheum. Dis.*, **2014**, *73*(2), 328-335.
<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203325> PMID: 23868909
- [76] Baneth, G.; Shaw, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **2002**, *106*(4), 315-324.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00115-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00115-2) PMID: 12079737
- [77] Chawla, B.; Madhubala, R. Drug targets in *Leishmania*. *J. Parasit. Dis.*, **2010**, *34*(1), 1-13.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12639-010-0006-3> PMID: 21526026
- [78] Petersen, C.A. Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States. *Top. Companion Anim. Med.*, **2009**, *24*(4), 182-188.
<http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2009.06.006> PMID: 19945086
- [79] Frézard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R. R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. *Mol.*, **2009**, *14*, 2317-2336.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules14072317>
- [80] Guerin, P.J.; Olliaro, P.; Sundar, S.; Boelaert, M.; Croft, S.L.; Desjeux, P.; Wasunna, M.K.; Bryceson, A.D.M. Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.*, **2002**, *2*(8), 494-501.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00347-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00347-X) PMID: 12150849
- [81] Honorable deliberative council of the city of posadas. In: *ORDENANZA II – N° 23 (Antes Ordenanza 191/98); Regime of Supermarkets and Shopping Centers*, **2007**.
- [82] Carneiro, L.A.; Vasconcelos dos Santos, T.; Lima, L.V.R.; Ramos, P.K.S.; Campos, M.B.; Silveira, F.T. First report on feline leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.*, **2020**, *19*, 100360.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100360> PMID: 32057387
- [83] Pereira, A.; Parreira, R.; Cristóvão, J.M.; Castelli, G.; Bruno, F.; Vitale, F.; Campino, L.; Maia, C. Phylogenetic insights on *Leishmania* detected in cats as revealed by nucleotide sequence analysis of multiple genetic markers. *Infect. Genet. Evol.*, **2020**, *77*, 104069.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104069> PMID: 31670155
- [84] Kalú Rivas, A.; Alcover, M.; Martínez-Orellana, P.; Montserrat-Sangrà, S.; Nachum-Biala, Y.; Bardagi, M.; Fisa, R.; Riera, C.; Baneth, G.; Solano-Gallego, L. Clinical and diagnostic aspects of feline cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Parasit. Vectors*, **2018**, *11*(1), 141.
<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-018-2747-2>
- [85] Akhtardanesh, B.; Sharifi, I.; Mohammadi, A.; Mostafavi, M.; Hakimipour, M.; Pourafshar, N.G. Feline visceral leishmaniasis in Kerman, southeast of Iran: Serological and molecular study. *J. Vector Borne Dis.*, **2017**, *54*(1), 96-102.
 PMID: 28352052
- [86] Bonfante-Garrido, R.; Urdaneta, I.; Urdaneta, R.; Alvarado, J. Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **1991**, *85*(1), 53.
[http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90153-P](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(91)90153-P) PMID: 2068760
- [87] Pennisi, M.G. Leishmaniasis of companion animals in Europe: An update. *Vet. Parasitol.*, **2015**, *208*(1-2), 35-47.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.023> PMID: 25573248
- [88] Salvatore, D.; Aureli, S.; Baldelli, R.; Di Francesco, A.; Tampieri, M.P.; Galuppi, R. Molecular evidence of *Leishmania infantum* in *Ixodes ricinus* ticks from dogs and cats, in Italy. *Vet. Ital.*, **2014**, *50*(4), 307-312.
<http://dx.doi.org/10.12834/VetIt.83.1222.2> PMID: 25546069
- [89] Vioti, G.; da Silva, M.D.; Galvis-Ovallos, F.; Alves, M.L.; da Silva, D.T.; Leonel, J.A.F.; Pereira, N.W.B.; Benassi, J.C.; Spada, J.C.P.; Maia, C.; Galati, E.A.B.; Starke-Buzetti, W.A.; Oliveira, T.M.F.S. Xenodiagnosis in four domestic cats naturally infected by *Leishmania infantum*. *Transbound. Emerg. Dis.*, **2022**, *69*(4), 2182-2190.
<http://dx.doi.org/10.1111/tbed.14216> PMID: 34229362
- [90] Montaner-Angoiti, E.; Llobat, L. Is leishmaniasis the new emerging zoonosis in the world? *Vet. Res. Commun.*, **2023**, *47*(4), 1777-1799.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11259-023-10171-5> PMID: 37438495
- [91] Bongiorno, G.; Meyer, L.; Evans, A.; Lekouch, N.; Bianchi, R.; Khoury, C.; Chiummo, R.; Thomas, E.; Gradoni, L. A single oral dose of fluralaner (Bravecto®) in dogs rapidly kills 100% of blood-fed *Phlebotomus perniciosus*, a main visceral leishmaniasis vector, for at least 1 month after treatment. *Med. Vet. Entomol.*, **2020**, *34*(2), 240-243.
<http://dx.doi.org/10.1111/mve.12420> PMID: 31769060
- [92] Queiroga, T.B.D.; Ferreira, H.R.P.; dos Santos, W.V.; de Assis, A.B.L.; de Araújo Neto, V.T.; da Câmara, A.C.J.; Fagundes Neto, J.C.; dos Reis, R.K.; Nascimento, M.S.L.; Gama, R.A.; Guedes, P.M.M.; Nascimento, M.; Gama, R.; Guedes, P. Fluralaner (Bravecto®) induces long-term mortality of *Lutzomyia longipalpis* after a blood meal in treated dogs. *Parasit. Vectors*, **2020**, *13*(1), 609.
<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-020-04489-1> PMID: 33276818
- [93] Brianti, E.; Falsone, L.; Napoli, E.; Gaglio, G.; Giannetto, S.; Pennisi, M.G.; Priolo, V.; Latrofa, M.S.; Tarallo, V.D.; Solarì Basano, F.; Nazzari, R.; Deuster, K.; Pollmeier, M.; Gulotta, L.; Colella, V.; Dantas-Torres, F.; Capelli, G.; Otranto, D. Prevention of feline leishmaniasis with an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar. *Parasit. Vectors*, **2017**, *10*(1), 334.
<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2258-6> PMID: 28705248
- [94] Alten, B.; Maia, C.; Afonso, M.O.; Campino, L.; Jiménez, M.; González, E.; Molina, R.; Bañuls, A.L.; Prudhomme, J.; Vergnes, B.; Toty, C.; Cassan, C.; Rahola, N.; Thierry, M.; Sereno, D.; Bongiorno, G.; Bianchi, R.; Khoury, C.; Tsirigotakis, N.; Dokianakis, E.; Antoniou, M.; Christodoulou, V.; Mazeris, A.; Karakus, M.; Ozbel, Y.; Arserim, S.K.; Erisoz Kasap, O.; Gunay, F.; Oguz, G.; Kaynas, S.; Tsertsvadze, N.; Tskhvaradze, L.; Giorgobiani, E.; Gramiccia, M.; Volf, P.; Gradoni, L. Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2016**, *10*(2), e0004458.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004458> PMID: 26900688
- [95] Faiman, R.; Cuño, R.; Warburg, A. Control of phlebotomine sand flies with vertical fine-mesh nets. *J. Med. Entomol.*, **2009**, *46*(4), 820-831.
<http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0412> PMID: 19645284

- [96] Owens, S.D.; Oakley, D.A.; Marryott, K.; Hatchett, W.; Walton, R.; Nolan, T.J.; Newton, A.; Steurer, F.; Schantz, P.; Giger, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected english foxhounds to anemic dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **2001**, *219*(8), 1076-1083.
<http://dx.doi.org/10.2460/javma.2001.219.1076> PMID: 11700704
- [97] Naucke, T.J.; Lorentz, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit. Vectors*, **2012**, *5*(1), 67.
<http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-67> PMID: 22463789

Tratamento da Leishmaniose canina no Brasil: uma revisão

Treatment of canine Leishmaniasis in Brazil: a review

DOI:10.34117/bjdv9n12-023

Recebimento dos originais: 03/11/2023

Aceitação para publicação: 05/12/2023

Nathália Castelo Branco Barros

Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR)

Instituição: Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Av. Universitária s/n, Ininga, Teresina - PI, Brasil, CEP: 64049-550

E-mail: nathaliacastelobranco12@gmail.com

Amanda Karoliny Figueredo Brito

Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR)

Instituição: Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Av. Universitária s/n, Ininga, Teresina - PI, Brasil, CEP: 64049-550

E-mail: mandykaroliny@gmail.com

Caroline de Jesus Sousa

Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR)

Instituição: Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Av. Universitária s/n, Ininga, Teresina - PI, Brasil, CEP: 64049-550

E-mail: carolsousa@ufpi.edu.br

Simone Santiago Carvalho de Oliveira

Pós-Doutoranda pelo Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes (LEAMER)

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Endereço: Avenida Carlos Chagas Filho 373, Ilha do Fundão, Cidade Universitária, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, CEP: 21941-901

E-mail: simonesantiagorj@yahoo.com.br

André Luis Souza dos Santos

Doutor em Ciências, Microbiologia

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Endereço: Avenida Carlos Chagas Filho 373, Ilha do Fundão, Cidade Universitária, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, CEP: 21941-901

E-mail: andre@micro.ufrj.br

Maria do Socorro Pires e Cruz

Graduada em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Av. Universitária s/n,

Ininga, Teresina - PI, Brasil, CEP: 64049-550

E-mail: mspcruz@ufpi.edu.br

RESUMO

Leishmaniose é causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* que atingem os seres humanos e animais domésticos, em especial os cães. As principais formas clínicas da doença são a tegumentar (LT) e a visceral (LV). A LV é endêmica em mais de 90 países, sendo o cão considerado o principal reservatório urbano da doença, mas que também pode desenvolver doença clínica conhecida como leishmaniose visceral canina (LVC). Conhecer as formas de tratamento e a resistência destes protozoários aos fármacos utilizados nos esquemas terapêuticos é de suma importância para identificar e combater esta doença em escala mundial. A diversidade de medicamentos disponíveis para o tratamento desta enfermidade é limitada, tanto para uso em humanos quanto em animais. Os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose possuem efeitos adversos graves, como nefrotoxicidade, bem como a necessidade de administração prolongada, de internação hospitalar para sua administração, além da possibilidade de surgimento de resistência por parte do parasito. Atualmente os insumos para a prevenção e o combate da LVC são coleiras impregnadas com inseticidas e o uso de medicamentos como a miltefosina e o alopurinol. Ainda há relatos de prescrição de medicamentos não autorizados para uso veterinário no Brasil, como anfotericina B e antimoniais pentavalentes, o que pode contribuir com a resistência parasitária. Além desses, na clínica médica veterinária, também é relatada a utilização de antibióticos e tratamento de suporte. Desta forma, torna-se necessária a descoberta de novos compostos com ação anti-*Leishmania*. O presente trabalho descreve os compostos utilizados para o tratamento da leishmaniose canina no Brasil.

Palavras-chave: resistência parasitária, avanços, terapias.

ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania* that affect humans and domestic animals, especially dogs. The main clinical forms of the disease are cutaneous (CL) and visceral (VL). VL is endemic in more than 90 countries, with dogs considered the primary urban reservoir of the disease, but they can also develop a clinical condition known as canine visceral leishmaniasis (CVL). Understanding the treatment options and the resistance of these protozoa to the drugs used in therapeutic regimens is of utmost importance to identify and combat this disease on a global scale. The diversity of drugs available for the treatment of this condition is limited, both for human and animal use. The drugs available for the treatment of leishmaniasis have serious adverse effects, such as nephrotoxicity, as well as the need for prolonged administration, hospitalization for their administration, and the possibility of parasite resistance emerging. Currently, the inputs for the prevention and control of CVL include insecticide-impregnated collars and the use of medications such as miltefosine and allopurinol. There are still reports of the prescription of unauthorized veterinary drugs in Brazil, such as amphotericin B and pentavalent antimonials, which can contribute to parasite resistance. In addition to these, the use of antibiotics and supportive treatment is also reported in veterinary medicine. Therefore, the discovery of new compounds with anti-*Leishmania* action becomes

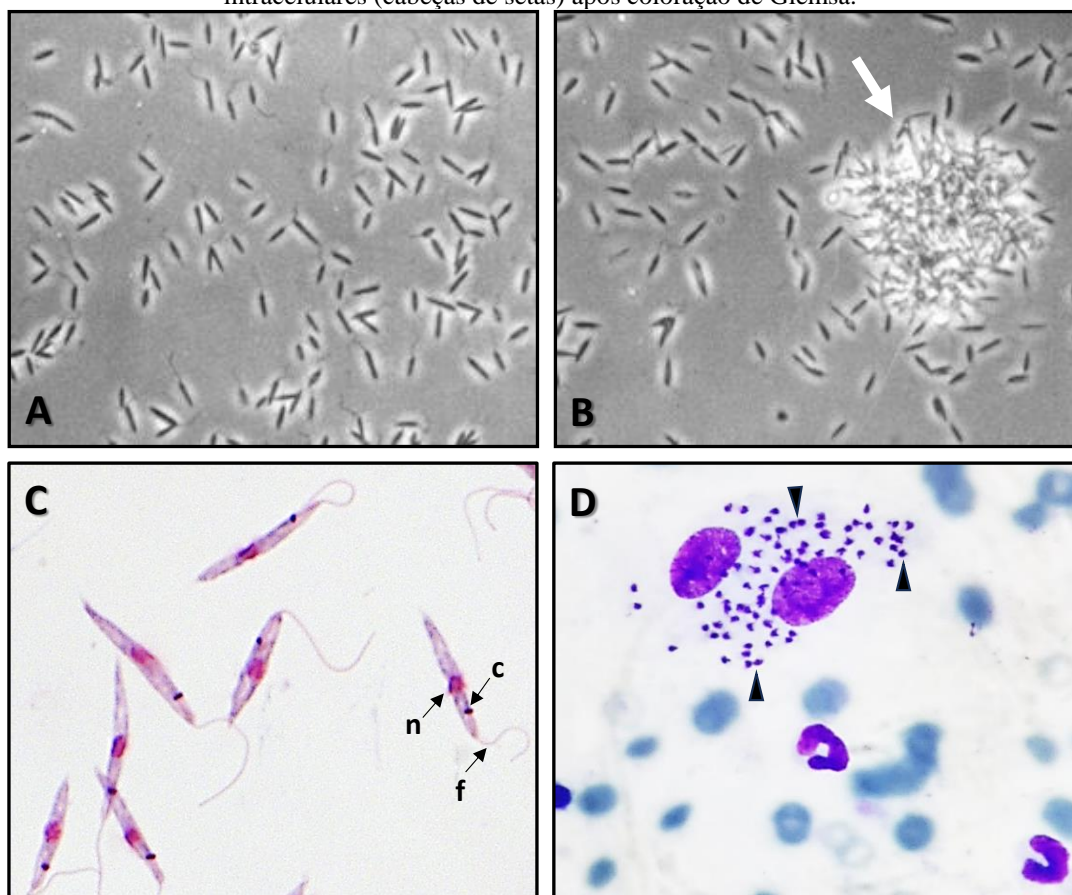
necessary. This paper describes the compounds used for the treatment of canine leishmaniasis in Brazil.

Keywords: parasitic resistance, advances, therapies.

1 INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias ainda são problemas muito graves nos países em desenvolvimento, sendo muitas delas causa importante de elevada morbidade e mortalidade entre seres humanos e animais, estando as leishmanioses incluídas entre estas doenças (1). A leishmaniose é uma enfermidade causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (classe, Kinetoplastida e família, Trypanosomatidae), que se apresentam sob duas formas morfológicas principais: a amastigota no hospedeiro vertebrado e a promastigota no hospedeiro invertebrado (**Figura 1**). O gênero *Leishmania* apresenta uma grande diversidade e variabilidade de espécies, sendo *L. infantum*, *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* as principais causadoras de leishmaniose no Brasil (2).

Figura 1. Microscopia de campo claro evidenciando as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*. (A) Cultivo a fresco de formas promastigotas. (B) Evidenciação da aglutinação (seta preta) de promastigotas. (C) Coloração de Giemsa evidenciando núcleo (n), cinetoplasto (c) e flagelo (f) das formas promastigotas. (D) Imprint da lesão de cão evidenciando formas amastigotas intracelulares (cabeças de setas) após coloração de Giemsa.



Fonte: Autor.

As principais formas clínicas da enfermidade são a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV). A LT é considerada uma doença que apresenta uma séria questão de saúde pública e envolve 85 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), a LV é endêmica em mais de 90 países e, no continente americano, está descrita em pelo menos 12 países. Dos casos registrados na América Latina, 90% ocorrem no Brasil. A doença vem sendo descrita em vários municípios brasileiros, apresentando mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominando em ambientes silvestres e rurais. Entretanto, com o passar dos anos, a doença foi se expandindo para centros urbanos, alcançando o número de cerca de 3.500 casos humanos por ano, com coeficiente de incidência de 2,0 casos/100.000 habitantes, com letalidade aumentando gradativamente, passando de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012 (3/32).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o Brasil é um país endêmico para leishmaniose. Dados sobre incidência e prevalência são importantes para a definição das estratégias de controle desta parasitose. Além disso, conhecer as opções terapêuticas disponíveis e os mecanismos de resistência desenvolvidos pelos parasitos, assim como propor novos potenciais medicamentos com diferentes mecanismos de ação são de extrema relevância (3,4).

A resistência é um processo de alteração de sensibilidade de um parasito a um determinado fármaco pelo aparecimento de modificações genéticas herdáveis. Do ponto de vista genético, a resistência é caracterizada por três aspectos principais: estabelecimento, desenvolvimento e dispersão. A utilização de um antiparasitário pode ocasionar um processo de seleção natural em uma população de parasitos, favorecendo à permanência dos microrganismos mais resistentes (5).

As doenças parasitárias têm grande impacto no bem-estar do homem e dos animais. O uso exacerbado de produtos químicos ocasionou uma série de problemas ambientais e, como consequência, tem-se o aparecimento de microrganismos resistentes. Gonçalves e colaboradores (6) demonstraram um aumento na resistência *in vitro* de *L. infantum* à miltefosina e à anfotericina B, utilizando cepas isoladas de um único cão submetido a repetidos tratamentos com miltefosina e alopurinol.

Produtos naturais, oriundos da química vegetal e da fitoquímica de espécies distribuídas pelos biomas do Brasil, são de grande interesse para investigação científica no combate a várias patologias, devido à intrincada relação vetor-hospedeiro, também poderão colaborar para o controle de vetores de doenças como a Malária, a Doença de Chagas, a Dengue e a Leishmaniose (31).

O presente trabalho tem como objetivo realizar um levantamento dos tratamentos utilizados para leishmaniose canina (**Figura 2**) no Brasil, assim como reportar as evidências de resistência parasitária descritas na literatura.

Figura 2. Úlcera com bordas elevadas localizada na pata anterior direita, não responsiva a tratamento tópico, com presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp.



Fonte: Autor.

2 DESENVOLVIMENTO

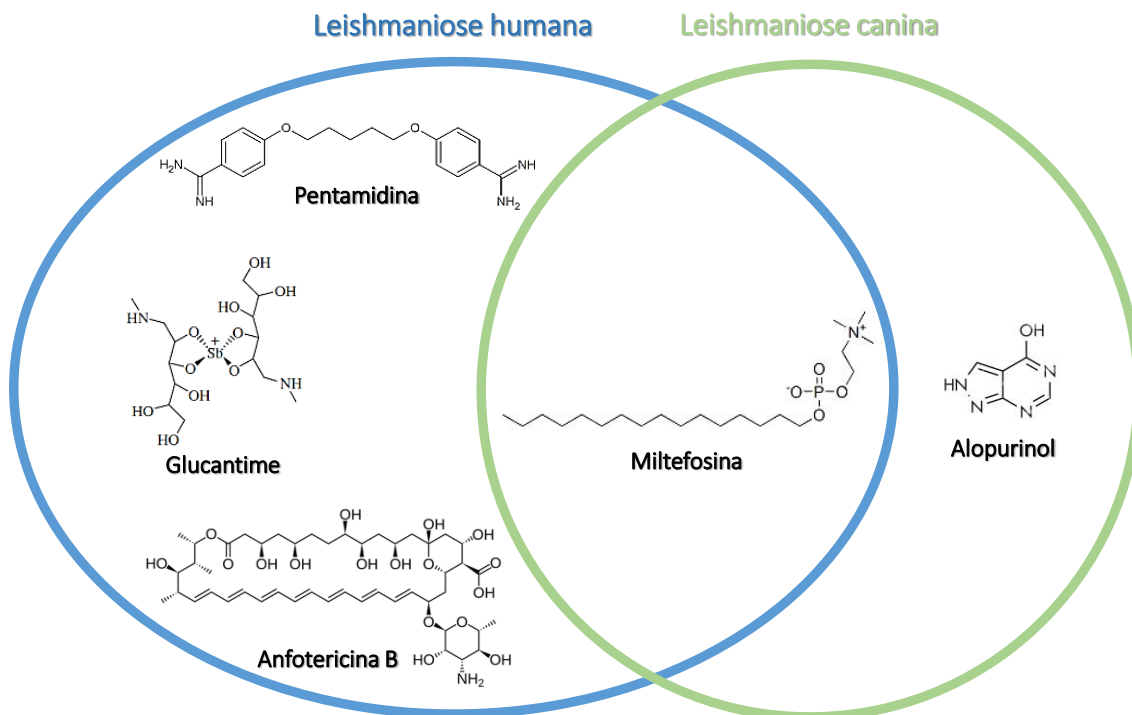
O Programa Nacional de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PNVCLV) do Ministério da Saúde do Brasil recomenda como metodologia de controle da LV (2021), a incorporação de coleiras impregnadas com inseticida (deltametrina a 4%) visando o controle da LV no Brasil, iniciando por municípios prioritários, por meio da nota técnica 05/2021 (7).

A diversidade de medicamentos disponíveis para essa finalidade é limitada e, além disso, estão associados a graves efeitos colaterais como nefro e hepatotoxicidade. Dificuldades como a necessidade de administração prolongada dos fármacos anti-*Leishmania* e de internação hospitalar dificultam o sucesso do tratamento. Estas características colaboram com o surgimento de resistência por parte do parasito (8).

O tratamento de escolha utilizado para leishmaniose é o mesmo desenvolvido há mais de um século (9). Os fármacos de eleição utilizados para o tratamento de casos humanos são quatro, dependendo da indicação médica e das condições clínicas do paciente, sendo estes: antimoniato de *N*-metil glutamina (glucantime), anfotericina B (preferencialmente a formulação lipossomal), isotionato de pentamidina e miltefosina (**Figura 3**). Já na medicina veterinária, em 2016, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil deferiu o registro do fármaco miltefosina, liberando seu uso para o tratamento de LVC através da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016

MAPA/MS (10). Além disso, há o uso do alopurinol. Existem ainda os medicamentos em que se faz uso associado, como marbofloxacina, metronidazol, cetoconazol, aminosidina, enrofloxacina e domperidona (11).

Figura 3. Fármacos usados no tratamento de leishmaniose humana e canina. A miltefosina foi colocada na interseção, pois é utilizada em alguns países como Índia.



Fonte: Autor.

Albuquerque e Lagoni (12) fizeram uma pesquisa através da aplicação de questionário avaliativo sobre o tratamento de LV empregados em clínicas de Brasília, uma cidade endêmica para a doença. Os autores enviaram o questionário para 40 clínicas veterinárias, obtendo-se 9 respostas. Destas, duas recusaram-se a contribuir e duas optavam por não tratar, recomendando a eutanásia. As cinco demais afirmaram realizar tratamento de animais com LV, as quais prescreviam alopurinol, quatro (4/5) utilizavam miltefosina, três (3/5) a marbofloxacina e duas (2/5) a anfotericina B e antimoniais pentavalentes.

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um análogo alquilfosfocolina que possui efeito leishmanicida. A miltefosina foi, a princípio, desenvolvida como agente antitumoral, mas atualmente está disponível para o tratamento (oral) da leishmaniose canina no Brasil, permitindo redução dos sintomas, devolvendo a qualidade de vida para o animal (8). Entretanto, este medicamento também possui efeitos colaterais graves, como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade no sistema digestório (13).

No ano de 2022, Hyam e colaboradores (14) fizeram um ensaio clínico *in vivo*, com 299 pessoas, na Índia, em que compararam o uso da miltefosina com o tratamento padrão, a anfotericina B. Esta pesquisa teve como resultado uma taxa de cura de 97% (290/299) com o uso da miltefosina (14).

A atividade antitumoral da miltefosina tem como alvo as vias de sinalização do fosfoinositol 3-cinase-Akt/PKB, as quais inibem o crescimento metastático das células. Em relação a sua atividade antiparasitária, têm-se pouca informação sobre o mecanismo de ação. Há hipóteses, como a indução de apoptose, distúrbio das vias de sinalização celular dependente de lipídios, alteração da composição da membrana celular e efeitos imunomoduladores (15).

Outro medicamento adotado para o tratamento de cães soropositivos no Brasil é o alopurinol, que apresenta ação leishmanioestática. Este fármaco não é utilizado no tratamento em leishmaniose humana. Todavia, é um fármaco reposicionado, uma vez que seu uso na medicina humana é para tratar o excesso de ácido úrico, enquanto na veterinária é utilizado para o tratamento da enfermidade em sua forma visceral (12).

Este princípio ativo é uma hipoxantina de administração oral, que ao ser metabolizado pela forma amastigota produz um análogo inativo da inosina, que é incorporado no ácido ribonucleico (RNA) dos parasitos induzindo alterações durante a síntese proteica, inibindo sua multiplicação. O principal efeito adverso é a formação de cristais de xantina nos rins que são excretados na urina, o que pode levar à formação de urólitos, principalmente em administrações de longo prazo (16).

A Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008 regulamenta o tratamento de cães com leishmaniose e proíbe o tratamento desta espécie com fármacos utilizados para o tratamento de casos humanos, uma vez que, até o momento, não existem estudos que demonstrem que os fármacos existentes de uso humano sejam eficazes para o tratamento de cães ou que comprovam que cães tratados com fármacos de uso humano promovem redução na transmissão da doença, ou ainda que o animal tratado não se mantenha como reservatório do parasito. Assim, o tratamento da LVC com produtos não registrados no MAPA é expressamente proibido no Brasil (10). Além disso, os fármacos autorizados para tratamento da LVC devem ser prescritos por médico veterinário e deve ser realizado o acompanhamento periódico do paciente (17).

A falta de tratamento efetivo para a cura total da doença canina e a polêmica sobre a eutanásia indiscriminada de cães soropositivos tem estimulado as buscas por estratégias de prevenção e controle da LVC, sendo uma delas a vacinação, que existe para uso em

cães mas não para humanos. Em 2014, duas vacinas disponíveis comercialmente foram licenciadas pelo Ministério da Agricultura do Brasil para uso em cães: Leish-Tec (Ceva Saúde Animal Ltda Paulínia - SP, Brasil) e Leishmune (Zoetis, Campinas, Brasil). No entanto, no mesmo ano o Ministério da Agricultura suspendeu a licença provisória concedida à vacina Leishmune por não atender aos requisitos de um ensaio clínico de vacina de fase III (18).

No Brasil havia uma vacina disponível contra LVC, a LeishTec, que foi descontinuada por eficiência diminuída. Esta tinha como antígeno a proteína recombinante A2 e como adjuvante a saponina. Esta proteína é expressa nas formas amastigotas de algumas espécies de *Leishmania*, como *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* (19).

Ait-Oudhia (20) reiterou que o tratamento medicamentoso é uma das formas de controle da doença e alternativa para reduzir a infectividade do cão. O uso destes fármacos requer longos períodos de administração, resultando em efeitos adversos graves, baixa tolerância por parte do animal e o desenvolvimento de cepas resistentes ao tratamento, contribuindo para a ineficácia dos regimes terapêuticos, além de apresentar custos elevados.

Fumarola et al. (21), em estudo para a descoberta de novas moléculas para o tratamento da leishmaniose, afirmaram que este conhecimento é estritamente necessário, pois embora os modelos animais estejam bem estabelecidos para testes de novos fármacos, eles não são adequados para triagens primárias de drogas em grande escala. Portanto, vários ensaios para testar a suscetibilidade de *Leishmania* sp. a novas moléculas *in vitro* estão em andamento, utilizando as duas formas de *Leishmania*: promastigotas e amastigotas. Essas duas formas são morfológica e bioquimicamente diferentes e esta é provavelmente a causa da diferente suscetibilidade nessas duas formas morfológicas de *Leishmania*.

Gonçalves et al. (6) realizaram testes *in vitro* com cepa recuperada de um cão naturalmente infectado por *L. infantum*. No trabalho, foram coletadas amostras antes do início do tratamento (T0) e após dois ciclos de tratamento (T1 e T2) com miltefosina e alopurinol, para avaliar a geração de amastigotas resistentes à miltefosina, anfotericina B e antimoniato de meglumina. Na metodologia avaliaram também as taxas de proliferação celular, infectividade e metaciclo-gênese, que se trata de mudanças morfológicas, funcionais e nos níveis de expressão de proteínas, dos isolados testados. Os resultados demonstraram um aumento gradual da resistência do protozoário à miltefosina e à

anfotericina B com o aumento do número de ciclos de tratamento. Uma tendência crescente na taxa de metaciclologênese de *L. infantum* também foi observada à medida que a resistência aos medicamentos aumentava. Estudos realizados há mais de uma década já demonstravam o desenvolvimento de resistência dos parasitos a estes fármacos, especialmente na Índia e no Sudão (6, 22).

Kazemi-Rad et al. (23) verificaram que a eficácia das drogas pentavalentes contra *Leishmania tropica* tem sido diminuída pelo desenvolvimento de parasitos resistentes em várias regiões endêmicas, especialmente na Índia, que geram como consequência altos índices de falha no tratamento com uso de antimonial. A falta de resposta aos antimoniais também foi bem documentada no Irã, onde pacientes humanos não respondem à terapia devido ao surgimento de resistência.

É possível optar pela escolha do tratamento medicamentoso ao invés da eutanásia dos animais positivos para leishmaniose. Moustapha et al. (24) fizeram um levantamento dos protocolos de tratamento para LVC no Brasil através de questionários, e verificaram que 80% dos veterinários indicaram o tratamento do animal em caso de leishmaniose confirmada, enquanto 3,08% ainda indicaram a eutanásia. Outra informação importante é que, embora não recomendados para o tratamento de cães, os antimoniais pentavalentes ainda são utilizados nos protocolos de tratamento, porém a maioria (75,4%) utiliza a miltefosina, seguido por alopurinol. Além destes, também são utilizados antibióticos como marbofloxacina e aminosidina e tratamento de suporte, como o uso de nutracêuticos ricos em glucana e os nucleotídeos. Quando se trata da vacinação, embora recomendada pela maioria dos veterinários (95,38%), ainda é uma prática pouco utilizada devido à baixa disponibilidade do produto nas clínicas. Dentre os veterinários, 95,4% indicam o uso de coleiras impregnadas com deltametrina 4% como prevenção.

As limitações dos tratamentos atuais contra a leishmaniose tanto em humanos quanto em animais, estão no tempo de administração dos medicamentos, que é muito longo e pode levar o paciente a ter muitos efeitos colaterais. Um exemplo são as pentamidinas que normalmente são utilizadas na Índia quando o tratamento com antimoniais não funciona. Estes compostos são nefrotóxicos, cardiotoxicos e podem levar a risco de morte, caso estes medicamentos não sejam utilizados de forma adequada, podendo, inclusive, levar ao aumento da resistência do parasito. Em novas pesquisas sobre o tratamento da leishmaniose, pontos importantes a serem considerados são as novas formulações que estão sendo testadas, o reposicionamento de fármacos já utilizados e as terapias combinadas. Nesta busca por novas drogas para o tratamento desta doença,

devemos assinalar, não somente a ação eficaz dessas novas drogas contra o parasito, mas também muitas são de baixo custo, com reduzida toxicidade para o hospedeiro e uma administração de curto prazo (25,30). A associação de diferentes compostos, revela-se de grande importância, com destaque para os compostos já utilizados atualmente, em associação com novas drogas, uma vez que a grande toxicidade dos tratamentos atuais e o surgimento de cepas resistentes tornou-se um grande desafio. Como exemplos destas associações temos as estudadas por Rebello et al. (26) que, em pesquisas *in vitro* e *in vivo* com camundongos infectados com *L. infantum*, testaram a combinação de Lopinavir (LPV) com miltefosina em um tratamento oral, analisando um comparativo entre a utilização dos compostos sozinhos ou associados, apresentando resultados vantajosos para a associação dos medicamentos que demonstraram maior eficácia do que quando utilizados sozinhos. Além disso, no estudo realizado não foi observado hepatotoxicidade relevante. Em mais pesquisas com associação de medicamentos, Branquinha et al. (27) avaliou a eficácia anti-*Leishmania* de inibidores de calpaína MDL28170 combinados com anfotericina B contra *L. amazonensis* e *L. infantum* demonstrando resultados satisfatórios, com diversas e graves alterações morfofisiológicas nas células dos parasitos. Para além disso, a combinação das duas drogas demonstrou exercer uma ação anti-amastigota significativa.

Produtos naturais e não processados são utilizados pela humanidade há séculos e difundidos por meio do conhecimento popular (28). A identificação de produtos naturais e a ampla gama de técnicas de separação dos princípios bioativos disponíveis aumentam a chance de se encontrarem novos produtos efetivos contra infecções por protozoários e podem ser fonte de novos e mais eficazes fármacos contra *Leishmania* spp. (29). Em revisão sobre a história, a evolução dos tratamentos e a descoberta de novas drogas, Cardoso *et al.* (30) pontuaram sobre os produtos naturais tendo destaque nas novas pesquisas sobre o tratamento contra a leishmaniose. Nestas novas buscas há três linhas principais de pesquisa que são: a exploração das vias metabólicas de *Leishmania* spp. visando encontrar novos alvos e obter novos compostos bioativos sintéticos; o reposicionamento de diversos fármacos já disponíveis no mercado farmacêutico com provável atividade anti-*Leishmania* e o uso de produtos naturais como fontes de novos protótipos de anti-protozoários (31, 32). Estes três pontos de pesquisa despontam para novas descobertas em relação à doença e às formas de tratamento.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As drogas eficazes para o tratamento da leishmaniose continuam sendo as mesmas usadas há mais de um século. Há evidências de resistência parasitária e algumas medidas foram tomadas para retardá-la, como a eliminação do principal hospedeiro definitivo por eutanásia e a proibição do tratamento canino com os fármacos de eleição para leishmaniose humana. Para a prevenção e combate da LVC no Brasil estão disponíveis coleiras impregnadas com deltametrina 4%, tratamento com medicamentos como a miltefosina e o alopurinol. No entanto, os autores reforçam a necessidade de novos estudos que visam a descoberta de novas estratégias e potenciais novos compostos com ação anti-*Leishmania*.

REFERÊNCIAS

1. Pinto CJ de C, Grisard EC, Ishida MMI. Parasitologia. Em 2011.
2. Vasconcelos JM, Gomes CG, Sousa A, Teixeira AB, Lima JM. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2018;50(3).
3. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral [Internet]. 2022. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>
4. Organização Pan-Americana da Saúde. LEISHMANIOSES Informe epidemiológico das Américas [Internet]. Estados Unidos; 2021 dez [citado 2022 nov 9]. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>
5. Alves MSD, Barbosa TN. Resistência parasitária. Em: *Fitoterapia e a Ovinocaprinocultura: uma associação promissora*. EdUFERSA; 2018. p. 49–76.
6. Gonçalves G, Campos MP, Gonçalves AS, Medeiros LCS, Figueiredo FB. Increased *Leishmania infantum* resistance to miltefosine and amphotericin B after treatment of a dog with miltefosine and allopurinol. *Parasit Vectors*. 2021 dez 1;14(1).
7. Ministério da Saúde. NOTA TÉCNICA N° 5/2021-CGZV/DEIDT/SVS/MS. Brasília, Brasília; 2021.
8. Tiwari N, Gedda MR, Tiwari VK, Singh SP, Singh RK. Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2017 abr 26;18(1).
9. Maquiaveli C do C, Oliveira e Sá AM, Vieira PC, da Silva ER. *Stachytarpheta cayennensis* extract inhibits promastigote and amastigote growth in *Leishmania amazonensis* via parasite arginase inhibition. *J Ethnopharmacol*. 2016 nov 4;192:108–13.
10. Bogiani PA, Oliveira RO de. Boletim Epidemiológico LEISHMANIOSE VISCERAL. Secretaria de Estado de Saúde. 2020 ago 13;32.
11. Athanasiou L V., Saridomichelakis MN, Kontos VI, Spanakos G, Rallis TS. Treatment of canine leishmaniosis with aminosidine at an optimized dosage regimen: A pilot open clinical trial. *Veterinary Parasitology*. 2013 Feb 18;192(1–3):91–7.
12. Albuquerque ALH de, Langoni H. A prática do tratamento na leishmaniose visceral canina (lvc) em clínicas veterinárias, cuidados e protocolos. *Veterinária e Zootecnia*. 2018 jun;25(1):132–41.
13. Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets [Internet]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012. Available from: www.elsevier.com/locate/apjtm

14. Hyam S, Undar S, Ha TKJ, Hakur CPT, Uergen J, Ngel E, et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis abstract. *New England Journal of Medicine*. 2002 Nov 28;347(22):1739–46. Available from: www.nejm.org
15. Paris C, Loiseau PM, Bories C, Bréard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2004 Mar;48(3):852–9.
16. Martino L di, Mantovani MP, Gradoni L, Gramiccia M, Guandalini S. Low dosage combination of meglumine antimoniate plus allopurinol as first choice treatment of infantile visceral leishmaniasis in Italy. *Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990 Jul-Aug;84(4):534-5.
17. Ministério da saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana [Internet]. 2^o ed. 2007. Available from: <http://www.saude.gov.br/editora>
18. de Mendonça LZ, Resende LA, Lanna MF, Aguiar-Soares RDDO, Roatt BM, Castro RADOE, et al. Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. *Parasite and Vectors*. 2016 ago 30;9(1).
19. Fernandes AP, Costa MMS, Coelho EAF, Michalick MSM, de Freitas E, Melo MN, et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*. 2008 out 29;26(46):5888–95.
20. Ait-Oudhia K, Gazanion E, Sereno D, Oury B, Dedet JP, Pratlong F, et al. *In vitro* susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Veterinary Parasitology*. 2012 jul 6;187(3–4):386–93
21. Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. Vol. 155, *Research in Microbiology*. 2004. p. 224–30.
22. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2004 set 20;7(3):339–49.
23. Kazemi-Rad E, Mohebbali M, Erfan MBK, Saffari M, Raoofian R, Hajjaran H, et al. Identification of antimony resistance markers in *Leishmania tropica* field isolates through a cDNA-AFLP approach. *Experimental Parasitology*. 2013 out;135(2):344–9.
24. Moustapha NA, Ligia E, Hoffmann L, Magdanelo B, Multari JN, Tellaroli G, et al. Abordagem da leishmaniose visceral canina (lvc) por médicos veterinários. *Veterinária e Zootecnia*. 2021;28.
25. Sangenito LS, Santos VS, Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos ALS, Oliveira SSC. Leishmaniasis and Chagas disease – neglected tropical diseases: treatment updates. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2019. Vol.19, No.3.

26. Rebello KM, Andrade-Neto VV, Gomes CRB, de Souza MVN, Branquinha MH, Santos ALS, et al. Miltefosine-lopinavir combination therapy against *Leishmania infantum* infection: *in vitro* and *in vivo* approaches. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology*. 9:229. doi: 10.3389/fcimb.2019.00229.
27. Branquinha MH, Araújo PSS, Oliveira SSC, Sangenito LS, Gonçalves DS, Seabra SH et al. Antileishmanial efficacy of the calpain inhibitor mdl28170 in combination with amphotericin b. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2022, 7, 29.
28. Khan I, Ahmad K, Khalil AT alha, Khan J, Khan YA li, Saqib MS hahab, et al. Evaluation of antileishmanial, antibacterial and brine shrimp cytotoxic potential of crude methanolic extract of Herb *Ocimum basilicum* (Lamiacea). *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 2015 jun 1;35(3):316–22.
29. Bapela MJ, Kaiser M, Meyer JJM. Antileishmanial activity of selected South African plant species. *South African Journal of Botany*. 2017 jan 1;108:342–5.
30. Cardoso EA, Silva AR, Carvalho GC, Manssour AG, Barbosa MLC, Santos ALS et al. Leishmaniasis: history, evolution of treatment and the need for new drugs. *Current Biotechnology*, 2014, 3, 279-288.
31. Gomes, NB de N., Iabrudi, RC, Rebelo, R. de M., Gaspar, S. Ávila, Varricchio, MCBN, Brioso, PST, da Silva, S., & Pyrrho, A. dos S. (2023). Leishmaniose, produtos naturais, bioeconomia e desenvolvimento sustentável. *Revista Brasileira de Desenvolvimento*, 9 (8), 25317–25333.
32. da Cruz, BR, de Lima, ADA, Barreto, FB, & de Carvalho, ER (2023). Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): formas de contaminação e coinfeção. *Revista Brasileira de Desenvolvimento*, 9 (7), 21718–21736