

Oftalmopatias em cães com leishmaniose visceral - tratamento com Alopurinol e diagnóstico por qPCR e citologia

Ophthalmopathies in Dogs with Visceral Leishmaniasis - Treatment with Allopurinol and Diagnosis by qPCR and Cytology

Sávio Matheus Reis de Carvalho¹, Kellen Matuzzy Silva de Melo¹, Társia Giabardo Silva Mendonça¹, Luana Dias de Moura¹, Elyse Medeiros Olímpio Bomfim¹, Jackellyne Geórgia Dutra e Silva Leite¹, Felipe Araújo de Alcântara Oliveira^{1,2} & Maria do Socorro Pires e Cruz^{1,2}

ABSTRACT

Background: Canine visceral leishmaniasis (CVL) is an infectious parasitic zoonotic disease endemic to several countries. Among the most common clinical symptoms of CVL are eye symptoms. The association between clinical, epidemiological and laboratory tests (e.g., serological and molecular tests) provides a definitive diagnosis, and the disease is treated with leishmanistatic and leishmanicidal drugs. Various diagnostic techniques stand out, among them, polymerase chain reaction (PCR) and conjunctival cytology. This paper describes the main ophthalmopathies in dogs affected by CVL, treated with allopurinol, and the detection of the protozoan by cytology and conjunctival swab PCR.

Materials, Methods & Results: This study involved 16 dogs treated with allopurinol and 6 dogs without treatment. Bone marrow aspirates were obtained from the sternum and popliteal lymph node. Samples for conjunctival qPCR were collected from both eyes of each animal, using a sterile swab. The animals underwent complete ophthalmic examination using halogen lighting, magnifying loupe, fundoscopy, and occasionally, direct ophthalmoscopy. Tests were also performed to assess tear production, intraocular pressure, ocular reflexes and the presence of corneal ulcers. Slides prepared for cytology were stained and DNA was extracted and stored for qPCR testing to estimate the parasite burden (PB). The collected data were then subjected to a qualitative analysis. Ophthalmic changes were found in 13 of the 16 treated animals (81.25%) and in 3 of the 6 animals not treated with allopurinol (50%). Sixteen of the 22 dogs (73%) were clinically symptomatic, showing 1 to 5 concurrent ocular clinical signs. Uveitis was the most common ocular condition and was detected in all the dogs with some form of ophthalmopathy. Corneal edema (31.25%; n = 5), keratoconjunctivitis sicca (25%; n = 4), periocular dermatitis (25%; n = 4), blepharitis (25%; n = 4) cataracts (18.75%; n = 3), and to a lesser extent, glaucoma, corneal ulcer, and 3rd eyelid prolapse (6.25%; n = 1 each), were also found. No *Leishmania* spp. amastigotes were identified by conjunctival cytology in any sample. The conjunctival swab qPCR revealed 19 dogs (86.36%) positive for CVL, most of them (37%; n = 7) with a PB of 3001 to 6500 copies of *Leishmania* spp. DNA. Among the dogs treated with allopurinol, 68.4% (n = 13) were PCR positive for CVL and most of them showed a PB of 955 to 3,000 copies of the parasite's DNA. Among the symptomatic dogs, the highest PB was detected in a dog with only 2 ocular disorders, while the lowest PB was found in the dog with the most numerous ocular disorders.

Discussion: Among the ocular changes found here, the higher frequency of uveitis is consistent with those reported for dogs with CVL. The high rate of ophthalmopathies in treated animals can be attributed to the leishmanistatic rather than leishmanicidal nature of allopurinol, which, as a monotherapy, does not completely eliminate the parasite from the dog's organism. The frequency of ophthalmic alterations observed in this study is compatible with that described in symptomatic and CVL positive dogs, both treated and untreated. The non-exfoliative collection method of conjunctival cytology may have generated false negative results. Conjunctival swab qPCR is able to detect *Leishmania* spp. DNA in dogs with and without ophthalmic alterations, but PB quantification may vary depending on the primers used. Although the number of ocular alterations is expected to be higher in animals with higher PB, in this study, dogs with higher PB did not necessarily exhibit more ophthalmic disorders. Conjunctival swab qPCR was more effective than conjunctival cytology for diagnosing CVL, even in dogs treated with allopurinol. As a monotherapy, allopurinol favors clinical improvement in dogs, but ocular lesions may persist, regardless of the conjunctival PB.

Keywords: *Leishmania*, dog, eye, conjunctiva.

Descritores: *Leishmania*, cão, olho, conjuntiva.

DOI: 10.22456/1679-9216.137186

Received: 22 December 2023

Accepted: 2 March 2024

Published: 10 April 2024

¹Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR) & ²Departamento de Morfofisiologia Veterinária (DMV), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brazil. CORRESPONDENCE: S.M.R. Carvalho [savioreis1995@gmail.com]. NUPCELT - CCA - UFPI. Rua Dirce de Oliveira n. 3397. Ininga. CEP 64048-550 Teresina, PI, Brazil.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença infecto-parasitária e zoonótica causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e transmitida pela picada de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, sendo endêmica em aproximadamente 90 países [19].

Cães acometidos pela enfermidade podem apresentar diversas manifestações clínicas, sendo as mais comuns a apatia, hiporexia, linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose, dermatopatias e oftalmopatias [1,14].

Métodos diagnósticos para leishmaniose visceral canina (LVC) disponíveis incluem testes sorológicos, moleculares, parasitológicos e imunológicos [7]. A associação de parâmetros clínicos, epidemiológicos e exames específicos permite o diagnóstico definitivo [9].

O tratamento da LVC envolve uma combinação de fármacos leishmanostáticos e leishmanicidas e a prevenção por uso de inseticidas devem ser consideradas como medidas adjuvantes no controle da doença [14,19].

Oftalmopatias geralmente encontradas em cães com LVC, acompanhadas ou não de sinais incluem alopecia periocular, blefarite, conjuntivite, uveíte e edema de córnea [16,18].

A Reação em Cadeia Polimerase (PCR) é considerada um teste robusto para diagnóstico de LVC por possuir alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar infecção antes da soroconversão e em cães assintomáticos. Técnicas menos invasivas vêm ganhando destaque, como a citologia e a PCR a partir de “swab” conjuntival [8,16].

O objetivo do presente trabalho é descrever as principais oftalmopatias em cães acometidos com leishmaniose visceral tratados a longo prazo com alopurinol, assim como a detecção do agente por meio da citologia e PCR de “swab” conjuntival.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos animais

Foram selecionados 22 cães, independente de idade, raça e sexo, oriundos da Associação Piauiense de Proteção e Amor aos Animais (APIPA). Os animais participantes foram divididos em 2 grupos, sendo estes grupos compostos de cães que receberam tratamento

com alopurinol por até 1 ano e os que não foram tratados. A pesquisa foi autorizada pela direção da associação, por meio da assinatura do termo de consentimento, livre e esclarecido.

Exame oftalmológico

Todos os animais participantes foram submetidos a exame oftálmico completo, incluindo olhos e anexos. A avaliação das pálpebras, conjuntiva palpebral e bulbar, 3ª pálpebra, córnea, esclera, câmara anterior, íris e pupila foram realizadas com a ajuda de uma luz de halogênio e uma lupa de magnificação com aumento de 3,5 x. Sempre que possível, o cristalino, humor vítreo, retina e nervo óptico foram avaliados por oftalmoscopia direta. Um colírio midriático¹ [Mydriacyl® - 10 mg/mL, dose 1 gota/olho] foi usado para a fundoscopia. A produção de lágrima foi avaliada por meio teste lacrimal de Schirmer² [Ophthalmos® - 1 tira /olho] e a pressão intraocular (PIO) por meio de um tonômetro de rebote; reflexo pupilar direto, consensual e ameaça; teste de fluoresceína e teste de Jones, com auxílio de corante de fluoresceínas em tiras secas² [Ophthalmos® - 1 tira/olho dissolvido em 1 mL de solução fisiológica 0,9%]. Os dados foram registrados na ficha de atendimento oftálmico.

Coleta e processamento de amostras

Para a coleta de material, os cães foram contidos manualmente, fazendo o uso da focinheira, em seguida submetidos a coleta de aspirado de medula óssea, realizado na crista do osso esterno e de linfonodo poplíteo, para confirmação da infecção.

Para a obtenção de material ocular foram coletadas amostras com auxílio de “swab” estéril, sendo utilizado um para cada olho. Para tanto, foi realizada uma leve tração manual da face palpebral da conjuntiva da 3ª pálpebra e parte interna das pálpebras. Com isso, foi realizada a coleta do material conjuntival da porção exposta, bem como da região do fórnice conjuntival em toda sua circunferência em ambos os olhos. O material obtido foi depositado em movimentos de rolagem sobre uma lâmina de microscopia para a citologia, acondicionados em meio de transporte (RPMI) e encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células Tronco (NUPCELT), da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina - PI, para processamento.

Extração de DNA e Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (qPCR)

O DNA foi extraído usando o PureLink Genomic DNA Minikit³ [InvitrogenTM[®]], seguindo as recomendações do fabricante para cada tipo de amostra. A quantidade de DNA foi determinada utilizando espectrofotômetro NanodropTM[®] 2000/2000c4 [Thermo Scientific]. Após a extração, o DNA foi identificado e mantido à temperatura de -20°C até a realização da qPCR.

A carga parasitária de cada animal foi determinada por qPCR utilizando amostras em triplicata. Os DNAs foram amplificados utilizando os primers: 5'GGTTAGCCGATGGTGGTCTT-3' e anti-sense 5'GCTATATCATATGTCCAAGCACTT

ACCT-3' e sonda TaqMan (5'ACCACCTAA-GGTCAACCC). Em um microtubo foram adicionados 5 µL de DNA (100 ng) a uma solução de 16 µL contendo 12,5 µL de TaqMan⁴ [2x PCR Master Mix, Applied Biosystems], 1,25 µL de cada primer, 1,0 µL TaqMan⁴ [sonda MGB, FAMTM, Applied Biosystems] e completando a reação com 4 µL de água Milli-Q, totalizando ao final uma solução de 25 µL. As reações foram amplificadas no ABI 7500 real Time PCR system, usando o SDS 2.0 software⁴ [Applied Biosystems], com ciclos de 95°C por 10 min para a desnaturação e 40 ciclos de 95°C por 15 s, seguido de 60°C por 1 min [15].

Análise estatística

As análises dos resultados foram feitas qualitativamente, demonstrando a frequência das alterações oculares e correlacionando a carga parasitária com o número de sinais oculares encontrados.

RESULTADOS

Dos 22 animais avaliados, 16 recebiam tratamento com alopurinol e 6 não recebiam nenhum tipo de tratamento. Dentre o grupo tratado, 13 animais apresentavam alterações oftalmológicas (81,25%) e 3 animais não apresentavam (18,75%). No grupo não tratado, metade apresentava alterações oftalmológicas, enquanto o restante não apresentava (Figura 1).

Do número de animais integrantes do grupo tratado, 73% (n = 16) apresentaram 1 ou mais alterações oftálmicas simultaneamente, tendo sido considerados clinicamente sintomáticos. A uveíte esteve presente em todos os cães e o edema de córnea foi o

2º sinal clínico mais frequente, tendo sido encontrado em 31,25% (n = 5) destes animais. Um 4º dos cães com sinais clínicos evidentes apresentaram ceratoconjuntivite seca, dermatite periocular ou blefarite. A catarata (18,75%; n = 3), juntamente ao glaucoma, úlcera de córnea e prolapso da terceira pálpebra, foram os sinais menos frequentes, tendo cada um destes últimos representado 6,25% (n = 1) de todas as afecções oculares detectadas (Figura 2).

Foi realizado citologia conjuntival nos 22 animais, em ambos os olhos, entretanto não foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* spp.

De todos os animais avaliados, 19 (86,36%) apresentaram resultados positivos para presença de *Leishmania* spp. por meio da qPCR pelo "swab" conjuntival. Quatro animais (21%) apresentaram carga parasitária entre 500 a 1.500 cópias de DNA de *Leishmania* spp., 5 (26%) apresentaram de 1.501 a 3.000 cópias, 7 (37%) apresentaram de 3.001 a 6.500 cópias e 3 (16%) tiveram valores maiores que 6.500 cópias (Figura 3).

Dentre os cães com resultado positivo na qPCR conjuntival, 13 (68,4%) estavam em tratamento com alopurinol, e destes, 5 (38%) apresentavam carga parasitária entre 955 e 3.000 cópias, 4 (31%) entre 3.001 e 6.000, e 4 (31%) carga acima de 6001. Todos os animais não tratados tiveram resultado positivo para LVC pela qPCR de conjuntiva.

A carga parasitária dos animais positivos variou entre 955 a 3.017.165 cópias de *Leishmania* spp. encontradas na conjuntiva. Dos 19 pacientes reagentes, 16 apresentaram entre 1 a 5 sinais oftalmológicos. Dentre os animais sintomáticos, foi possível observar que o cão com maior carga parasitária do estudo apresentava apenas 2 alterações oculares, e que o cão com maior número de alterações oftálmicas apresentou uma das menores cargas. Foi observado também que o cão com a 2ª maior carga parasitária não apresentava nenhuma alteração ocular (Figura 4).

DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma doença zoonótica que está presente em todo território nacional, sendo a região nordeste uma das mais acometida no país. Uma das prováveis justificativas para o maior aparecimento da doença na região nordeste se dá devido a condições socioeconômicas, de condições precárias de moradia e de saneamento básico em alguns estados da região [19].

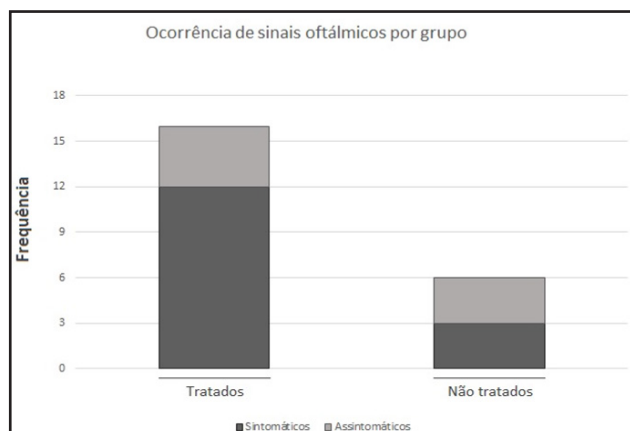


Figura 1. Ocorrência de sinais oftalmológicos em animais tratados e não tratados com alopurinol.

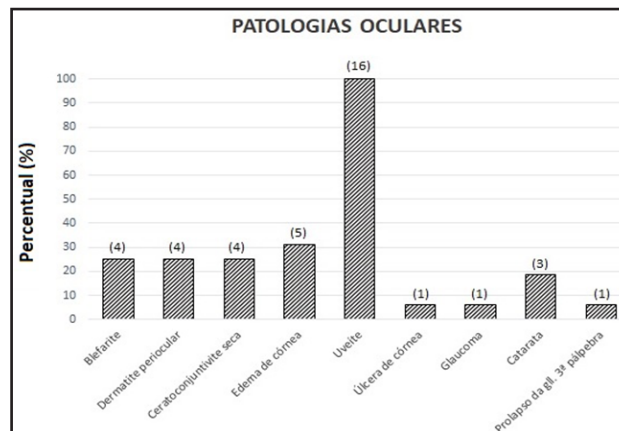


Figura 2. Percentual das patologias oculares encontradas em cães com leishmaniose visceral, tratados ou não com alopurinol.

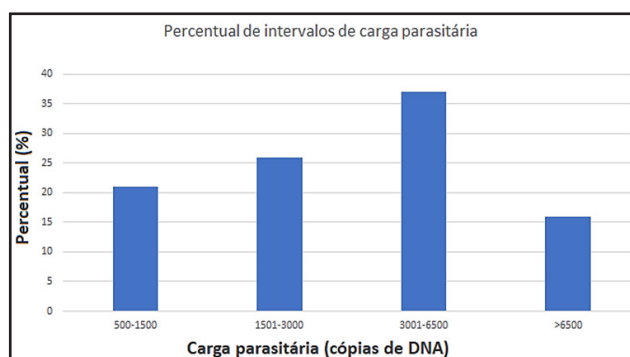


Figura 3. Carga parasitária de *Leishmania* spp. encontradas por qPCR de amostras obtidas por "swab" de conjuntiva ocular de cães positivos para leishmaniose visceral, tratados ou não com alopurinol.

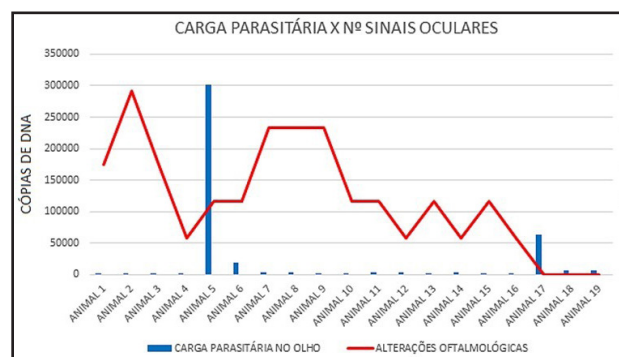


Figura 4. Correlação da carga parasitária do qPCR conjuntival com o número de sinais oftálmicos em cães tratados ou não com alopurinol.

Os cães acometidos pela doença apresentam uma diversidade de sinais clínicos sistêmicos e, considerando os sinais oftalmológicos, os animais podem apresentar alterações como uveíte, blefarite e ceratoconjuntivite seca [12,13].

O alopurinol vem sendo usado no tratamento da LVC há muito tempo, seja de forma isolada ou em associação a outros fármacos. No presente estudo, 81,25% dos animais tratados com este fármaco apresentavam pelo menos 1 sinal clínico oftalmológico. Este fármaco consiste em uma droga leishmanioestática, ou seja, não elimina o parasita, apenas controla a carga parasitária por determinado tempo, o que pode justificar o elevado índice de alterações oculares em animais tratados com a medicação de forma isolada [3]. A combinação de miltefosina com alopurinol tem demonstrado ser eficaz diminuindo a carga parasitária, porém, para se ter um efeito por tempo prolongado, faz-se necessário o emprego de imunoterapia [15].

As manifestações oculares observadas com maior frequência em animais acometidos pela doença neste estudo foram: blefarite, ceratoconjuntivite seca e uveíte [18]. Oftalmopatias como coriorretinites, descolamento de retina, catarata, glaucoma, são relacionadas com menor frequência [6,16]. Nossos achados assemelham-se aos já descritos na literatura, tendo sido encontrado uveíte, dermatite periocular, blefarite, ceratoconjuntivite seca, edema de córnea, úlcera de córnea, catarata, glaucoma e prolapso de glândula terceira pálpebra, tanto em animais tratados como não tratados.

No nosso estudo, a uveíte foi a alteração mais frequente concordando com outros estudos prospectivos realizados na cidade de Teresina-PI, que demonstraram que 95% dos animais com LVC avaliados apresentaram uveíte e 26% ceratoconjuntivite seca [10,11]. Em estudos realizados em Belo Horizonte-MG, os autores demonstraram que blefarite (25,4%), uveíte (23,8%), conjuntivite (20%), ceratoconjuntivite seca

(15,4%), alopecia periocular (13,9%), descolamento de retina (9,2%) e ceratite (7,7%) foram as alterações mais prevalentes. Em um estudo realizado na cidade de Recife-PE, a uveíte foi a alteração ocular de maior ocorrência nos animais acometidos com LVC, sendo a conjuntiva e úvea as estruturas que mais sofrem alterações devido a sua maior vascularização [4,6].

A citologia conjuntival foi um dos exames utilizados com finalidade de observar a ocorrência do parasita. Estudos relatam a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em amostras coletadas utilizando “swab” estéril da conjuntiva e córnea de animais infectados [4,17].

Nas amostras de citologia conjuntival analisadas neste estudo não foram observadas formas amastigotas do parasita, diferindo de alguns relatos da literatura que detectaram estas formas por meio de citologia ocular, utilizando escova para a coleta de amostras para citologia esfoliativa. O exame parasitológico é o teste padrão-ouro para diagnóstico da leishmaniose, pois se trata de um método altamente específico. Porém sua sensibilidade depende de alguns fatores, como a carga parasitária [12].

A qPCR é um meio diagnóstico com grande sensibilidade e especificidade, e a conjuntiva ocular é uma das fontes de amostras utilizadas neste tipo de exame. A PCR permite a identificação do DNA do parasito causador da leishmaniose em vários tecidos, como, por exemplo, fígado, baço, sangue, medula óssea e conjuntiva. A eficiência do exame depende do método de extração de DNA, do protocolo utilizado e do material analisado [1,12].

Em relação a carga parasitária, foi observado que 21% dos cães submetidos ao tratamento com alopurinol apresentaram carga variando de 500 a 1.500 cópias de DNA do parasito, 26% de 1.501 a 3.000 cópias, 37% apresentaram de 3.001 a 6.500 cópias e 16% tiveram valores maiores que 6.500 cópias. Resultados diferentes foram relatados na Bahia, onde 10,3% dos cães apresentaram carga entre 1 e 10 parasitas, 69% entre 11 e 100 parasitas, 20,7% entre 101 e 1.000 parasitas, e nenhum paciente apresentou carga parasitária maior que 1.001 parasitas.

Com relação aos animais não tratados, todos apresentaram o DNA do parasito detectável na PCR de amostra conjuntival e 38% tiveram carga parasitária entre 955 e 3.000 cópias, 31% entre 3.001 e 6.000, e 31% carga acima de 6.001. A PCR de “swab” conjun-

tival possibilita diagnóstico sensível e específico para leishmaniose e poderia ser considerada para diagnóstico menos invasivo da doença [2].

No presente estudo, a carga parasitária dos animais positivos variou entre 955 a 3.017.165 cópias de *Leishmania* spp., valores estes considerados altos, frente a resultados encontrados em outros estudos, nos quais as cargas parasitárias mais baixas foram de PCR de mucosas conjuntival, nasal e oral. Estas diferenças podem ser devidas aos iniciadores (“primers”) utilizados para a realização da PCR [12].

Em grande parte dos cães reagentes para LVC, foi observada de 1 a 5 alterações oftalmológicas, o que variou entre os diferentes animais, pois o cão com maior carga parasitária apresentou apenas 2 sinais oftálmicos, e que o cão com maior percentual de alterações oculares apresentava baixa carga, além da 2ª maior carga não ser acompanhada de nenhum sinal ocular. Em estudo comparativo utilizando aspirado de baço, pele e sangue de animais sintomáticos e assintomáticos, foi possível observar que o maior percentual dos cães assintomáticos apresentou baixa carga (1 a 100 parasitos para cada 100 ng de DNA parasitos) nas amostras de sangue (83%) e pele (90%), e nas amostras do baço, as cargas foram maiores em cães polissintomáticos quando comparados a cães assintomáticos [5].

Relatos da literatura afirmam que pacientes tratados com associação de miltefosina e alopurinol, apresentaram 37,5% de remissão total dos sinais clínicos oftálmicos e 62,5% remissão parcial [14]. Além disso, observa-se que em alguns cães positivos para LVC na PCR de tecido conjuntival, negativaram após ser instituído tratamento por 28 dias. Em nosso estudo, o alopurinol foi utilizado como monoterapia, o que pode ter levado a não remissão dos sinais clínicos oftálmicos.

CONCLUSÃO

Diante disso, podemos concluir que os animais submetidos ao tratamento por longo tempo com alopurinol, em monoterapia, podem alcançar melhora clínica, porém as lesões oculares podem persistir, independentemente da carga parasitária encontrada na conjuntiva. A PCR de conjuntiva ocular propicia um diagnóstico sensível e específico para leishmaniose, mesmo quando os cães estão sob tratamento com alopurinol. Em contrapartida, a citologia conjuntival neste estudo demonstrou ser pouco eficaz para o diagnóstico desta enfermidade.

MANUFACTURERS

¹Alcon - Novartis Company. Geneva, Switzerland.

²Ophthalmos. São Paulo, São Paulo, Brazil.

³Invitrogen. Waltham, MA, USA.

⁴Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA, USA.

Acknowledgements. We are grateful to the Piauí Association for the Protection and Love of Animals (APIPA), for providing the data for this study.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 **Alvar J., Cañavate C., Molina C., Moreno J. & Nieto J. 2004.** Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. 57: 1-88. DOI: 10.1016/S0065-308X (04)57001-X.
- 2 **Barbosa V.T., Barbosa V. T., Silva M.A.G., Sousa M.G., Gering A.P., Santos H.D. & Laus J.L. 2012.** Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 64(6): 1465-1470. DOI: 10.1590/S0102-09352012000600009.
- 3 **Brito F.L.C., Alves L.C., Maia F.C.L., Santos E.S.C., Laus J.L. & Meunier I.M.J. 2006.** Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 58(5): 768-775. DOI: 10.1590/S0102-09352006000500011.
- 4 **Brito F.L.C., Alves L.C., Maia F.C.L., Albuquerque A.R., Ortiz J.P.D. & Laus J.L. 2007.** Formas amastigotas semelhantes a *Leishmania* sp. sobre ulceração de córnea em cão: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59(1): 81-84. DOI: 10.1590/S0102-09352007000100014.
- 5 **Ciaramella P., Oliva G., Luna R.D., Gradoni L., Ambrósio R., Cortese L., Scalone U. & Persechino U. 1997.** A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Research*. 141(21): 539-543. DOI: 10.1136/vr.141.21.539.
- 6 **Dantas-Torres F. & Brandão-Filho S.P. 2006.** Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39: 352-356. DOI: 10.1590/S0037-86822006000400007.
- 7 **Di Pietro S., Bosco V.R.F., Crino C., Francaviglia F. & Giudice E. 2016.** Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary World*. 9(6): 633-637. DOI: 10.14202/vetworld.2016.633-637.
- 8 **Faria A.R. & Andrade H.M. 2012.** Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 3(2): 47-57. DOI: 10.5123/S2176-62232012000200007.
- 9 **Ferreira S.A., Ituassu L.T., Melo M.N. & Andrade A.S.R. 2008.** Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 152(3-4): 257-263. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.12.022.
- 10 **Freitas J.C., Nunes-Pinheiro D.C.S., Lopes Neto B.E., Santos G.J.L., Abreu C.R.A., Braga R.R., Campos R.M. & Oliveira L.F. 2012.** Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45(1): 24-29. DOI: 10.1590/S0037-86822012000100006.
- 11 **Freitas M.V.M., Brun C.F.L., Rodrigues M.C., Alves G.B.B., Leal A.F., Silva E.M.C., Lucas Grolli L. & Quesada A.M. 2017.** Ocular diseases in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí, Brazil. *Ciência Rural*. 47(10): e20170029. DOI: 10.1590/0103-8478cr20170029.
- 12 **Maia C. & Campino L. 2008.** Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*. 158(4): 274-287. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.07.028.
- 13 **Manna L., Corso R., Galiero G., Cerrone A., Muzj P. & Gravino A.E. 2015.** Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites & Vectors*. 8(1): 289. DOI: 10.1186/s13071-015-0896-0.
- 14 **Mendes S.W., Silva A.A.M., Trovão J.R., Silva A.R. & Costa J.M.L. 2002.** Expansão espacial da Leishmaniose visceral Americana em São Luís do Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(3): 227-231. DOI: 10.1590/S0037-86822002000300005.
- 15 **Nascimento L.F.M., Miranda D.F.H., Moura L.D., Pinho F.A., Werneck G.L., Khouri R., Reed S.G., Duthie M.S., Barral A., Barral Netto M. & Cruz M.S.P. 2020.** Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in *L. infantum*-infected dogs. *Vaccine*: X. (4): 100048. DOI: 10.1016/j.jvax.2019.100048.

- 16 Oliva G., Roura X., Crotti A., Maroli M., Catagnaro M., Gradoni L., Lubas J., Paltrinieri S., Zatelli A. & Zini E. 2010.** Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 236(11): 1192-1198. DOI: 10.2460/javma.236.11.1192.
- 17 Peña M.T., Naranjo C., Klauss G., Fondevila D., Leiva M., Roura X., Davidson M.G. & Dubielzig R.R. 2008.** Histopathological Features of Ocular Leishmaniosis in the Dog. *Journal of Comparative Pathology*. 138(1): 32-39. DOI: 10.1016/j.jcpa.2007.09.004.
- 18 Peña M.T., Roura X. & Davidson M.G. 2000.** Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Veterinary Ophthalmology*. 3(1): 35-41. DOI: 10.1046/j.1463-5224.2000.00106.x.
- 19 Werneck G.L. 2014.** Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de Saúde Pública*. 48(5): 851-856. DOI: 10.1590/S0034-8910.2014048005615.