

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

KATHARINE COSTA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO E DA EFICÁCIA DO PRINCÍPIO ATIVO
FLURALANER (BRAVECTO®) CONTRA INFESTAÇÃO POR *Tunga*
penetrans EM CÃES**

ILHÉUS- BAHIA

2021

KATHARINE COSTA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO E DA EFICÁCIA DO PRINCÍPIO ATIVO
FLURALANER (BRAVECTO®) CONTRA INFESTAÇÃO POR *Tunga*
penetrans EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof. DSc. Renata Santiago Alberto Carlos.

ILHÉUS- BAHIA

2021

S237

Santos, Katharine Costa dos.

Avaliação do tratamento e da eficácia do princípio ativo fluralaner (Bravecto®) contra infecção por *Tunga penetrans* em cães / Katharine Costa dos Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2021.

82 f. : il.; anexos.

Orientadora: Renata Santiago Alberto Carlos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Inclui referências.

1. Cães – Doenças – Tratamento. 2. Doenças parasitárias. 3. Pulgas. 4. *Tunga penetrans*. I. Título.

CDD 636.70896

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO E DA EFICÁCIA DO PRINCÍPIO ATIVO
FLURALANER (BRAVECTO®) CONTRA INFESTAÇÃO POR *Tunga
penetrans* EM CÃES**

Ilhéus - Bahia, 23/02/2021

Renata Santiago Alberto Carlos - DSc UESC/PPGCA
(Orientadora)

Paula Elisa Brandão Guedes - PhD. UESC/PPGCA

Fernando de Almeida Borges - DSc UFMS

ILHÉUS- BAHIA

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ser meu alicerce, me proporcionar saúde e força para concluir essa etapa profissional com êxito.

Agradeço à professora e orientadora Renata Santiago Alberto Carlos pelo direcionamento e dedicação durante esse ano, e por ser exemplo de pesquisadora e inspiração para seus orientandos.

Agradeço aos meus pais por todo esforço e incentivo, em especial à minha mãe, minha grande apoiadora e principal incentivadora.

Agradeço aos meus companheiros na jornada da pós-graduação, em especial aos que me auxiliaram durante o experimento, Anderson Oliveira, Paula Elisa Brandão, Tatiani Harvey, Anaiá Paixão, Joana Thaisa, Zelina dos Santos, pelo apoio e parceria durante o meu projeto.

Agradeço aos parceiros Gabriela Mota por ajudar com a realização dos hemogramas no laboratório de Análises Clínicas, e ao Prof. Alexandre Munhoz, pela cessão do espaço.

Agradeço à FAPESB pela bolsa de estudos do meu mestrado e à empresa MSD Animal Health Innovation GmbH, fabricante do fármaco Bravecto®, pelo financiamento do projeto.

Agradeço a todos os docentes da pós-graduação que contribuíram para o meu desenvolvimento como pesquisadora, a todos os funcionários que contribuíram para o meu desenvolvimento durante o mestrado.

Agradeço especialmente aos tutores e animais que participaram e se comprometeram com o meu projeto de pesquisa, e ao apoio de Tais Passos Cardoso, sem ela tudo teria sido muito difícil.

RESUMO

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO E DA EFICÁCIA DO PRINCÍPIO ATIVO FLURALANER (BRAVECTO®) CONTRA INFESTAÇÃO POR *Tunga penetrans* EM CÃES

A tungíase é uma zoonose caracterizada por lesões cutâneas causadas pela penetração da pulga *Tunga penetrans* na pele do hospedeiro, que pode resultar em quadros clínicos graves, especialmente em cães oriundos de comunidades carentes endêmicas. O presente ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo visou determinar a eficácia terapêutica e residual do princípio ativo fluralaner em cães naturalmente infestados com *T. penetrans*. Foram avaliados 62 cães do Povoado da Juerana, Município de Ilhéus, Bahia, divididos em Grupo Tratamento (GT), que recebeu o inseticida na dose de 25 a 56 mg/kg, uma única vez, e Grupo Controle (GC) que não recebeu o tratamento, ambos com 31 animais. Foram realizadas nove visitas, nos dias 0 (inclusão e tratamento), + 7 (± 2), + 14 (± 2), +21 (± 2), +28 (± 2), + 60 (± 7), +90 (± 7), +120 (± 7), +150 (± 7), nos quais foram realizadas avaliações clínicas e parasitológica da pele em todos os cães. As lesões foram estadiadas conforme classificação de Fortaleza, documentadas, e um escore de gravidade para tungíase canina (SCADT) foi empregado para avaliar a condição clínica dos animais do estudo. A eficácia primária foi baseada na porcentagem de cães livres do parasita após o tratamento, o GT apresentou superioridade significativa ($p < 0,025$) em comparação com o GC do dia +7 até ao dia +120. Entre o +21 e +60, todos os cães que receberam fluralaner apresentaram-se livres de lesões cutâneas vitais. A eficácia secundária avaliada com base no número de pulgas vivas e SCADT foi superior a 90% do dia +7 ao +90, e teve diferença significativa em todos os pontos de tempo após o tratamento ($p < 0,05$) para contagem de pulgas, e a comparação da gravidade avaliada para tungíase canina aguda mostrou uma diferença significativa entre os grupos do dia +7 ao +120 ($p < 0,05$). Conclui-se que o tratamento com fluralaner em cães foi eficaz para eliminar e prevenir pulgas da espécie *T. penetrans* do dia +7 ao dia +120. A condição clínica do GT foi melhor do que o GC durante o período das avaliações. Não houve reação adversa associada ao fluralaner nos cães tratados.

Palavras-chave: *Canis lupus familiaris*, ectoparasitose, isoxazolinas, pulgas, tratamento, tungíase.

ABSTRACT
EVALUATION OF THE TREATMENT AND EFFECTIVENESS OF THE
FLURALANER ACTIVE PRINCIPLE (BRAVECTO®) AGAINST INFESTMENT
BY *Tunga penetrans* IN DOGS

Tungiasis is a zoonosis characterized by skin lesions caused by the penetration of the *Tunga penetrans* flea into the host's skin, which can result in severe clinical conditions, especially in dogs from endemic underserved communities. The present randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial aimed to determine the therapeutic and residual efficacy of the active ingredient fluralaner in dogs naturally infested with *T. penetrans*. 62 dogs from Povoado da Juerana, Municipality of Ilhéus, Bahia, were evaluated, divided into Treatment Group (GT), which received the insecticide at a dose of 25 to 56 mg / kg, only once, and Control Group (CG), which did not receive treatment, both with 31 animals. Nine visits were made on days 0 (inclusion and treatment), + 7 (± 2), + 14 (± 2), +21 (± 2), +28 (± 2), + 60 (± 7), + 90 (± 7), +120 (± 7), +150 (± 7), in which clinical and parasitological evaluations of the skin were performed in all dogs. The lesions were documented according to the Fortaleza classification, and a severity score for canine tungiasis (SCADT) was used to assess the clinical condition of the animals in the study. The primary efficacy was based on the percentage of dogs free of the parasite after treatment, the GT showed significant superiority ($p < 0.025$) compared to the CG from day +7 to day +120. Between +21 and +60, all dogs that received fluralaner were free of vital skin lesions. Secondary efficacy assessed based on the number of live fleas and SCADT was greater than 90% of the day +7 to +90, and had a significant difference at all time points after treatment ($p < 0.05$) for flea counts, and the comparison of the severity assessed for acute canine tungiasis showed a significant difference between the groups from day +7 to +120 ($p < 0.05$). It is concluded that a single administration of fluralaner in dogs is effective to eliminate and prevent fleas of the species *T. penetrans* from day +7 to day +120. The clinical condition of the TG was better than the CG during the evaluation period. There were no adverse reactions associated with fluralaner in the treated dogs.

Keywords: *Canis lupus familiaris*, ectoparasitosis, isoxazolines, fleas, treatment, tungiasis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DIFERENTES LOCALIZAÇÕES DE LESÕES ECTÓPICAS CAUSADAS POR <i>Tunga penetrans</i>	10
FIGURA 2. OS CINCO ESTÁGIOS DAS LESÕES CAUSADAS POR <i>Tunga penetrans</i>	13

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 TUNGÍASE	10
2.2 FLURALANER.....	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
4. ARTIGO CIENTÍFICO.	29
5. ANEXO I	61

1. INTRODUÇÃO

Em países com baixos indicadores de desenvolvimento humano as doenças zoonóticas negligenciadas são um importante problema de saúde pública. Em virtude dessas enfermidades, complicações graves, sequelas irreversíveis e morte são realidade nessas populações (MOLYNEUX et al., 2017). Um exemplo dessas doenças é a tungíase, uma ectoparasitose tropical, que aflige populações marginalizadas em localidades com recursos escassos (FELDMEIER et al., 2014), nas quais as condições de vida são precárias, como nas comunidades rurais, na periferia de cidades pequenas e nas favelas dos grandes centros (HEUKELBACH et al., 2006).

A tungíase é caracterizada pela penetração da pulga *Tunga penetrans*, o popular bicho-de-pé no Brasil, na epiderme humana ou animal em contato com o solo arenoso (HEUKELBACH et al., 2001; THIELECKE et al., 2013). Os animais mais acometidos pela tungíase são cães, que é também a principal espécie de companhia dos seres humanos (HEUKELBACH et al., 2004). As infestações são autolimitadas, no entanto em áreas endêmicas a re-infestação ocorre constantemente e os indivíduos afetados (homem ou animal) apresentam grande número de pulgas em diferentes estágios de desenvolvimento (HEUKELBACH et al., 2006; ARIZA et al., 2007). Dependendo da região geográfica, a incidência de tungíase pode ser semelhante ao longo do ano (HARVEY et al., 2019) ou seguir uma variação sazonal, com pico de transmissão durante a estação seca (HEUKELBACH et al., 2005).

Posteriormente à penetração cutânea, as pulgas fêmeas adultas desenvolvem-se e permanecem lá até morrerem *in situ*, após quatro a seis semanas (HEUKELBACH et al., 2004). Durante esse período desenvolve-se uma inflamação local, que na maioria dos casos é complicada por infecções bacterianas secundárias (HEUKELBACH et al., 2001; EISELE et al., 2003) podendo progredir para deformidade e/ou perda do(s) dígito(s), septicemia e óbito do indivíduo (JOSEPH et al., 2006). As alterações clínicas nos cães são similares ao que ocorre em humanos (HEUKELBACH et al., 2004). Além disso, estudos comprovam que as lesões causadas pela *T. penetrans* podem atuar como porta de entrada para o *Clostridium* sp. em humanos, causando tétano (HEUKELBACH, 2006).

Assim, diante da importância dessa zoonose na saúde humana e animal, estudos visando o combate à tungíase animal contribuem para a melhoria da saúde pública nas regiões endêmicas. Até o momento não existe nenhum tratamento ou prevenção eficaz para a infestação contra esse ectoparasita em cães, apesar de ser considerado o principal reservatório e dispersor dessa ectoparasitose na América do Sul (EISELE et al., 2003; THIELECKE et al., 2014). Objetiva-se com este estudo, definir a eficácia inseticida do tratamento com o fármaco fluralaner, em cães infestados com *T. penetrans* em condições de campo. Devido ao efeito sistêmico e duradouro da formulação desse inseticida em outras espécies de pulgas, como *Ctenocephalides felis*, o princípio ativo é uma oportunidade de tratamento e controle da tungíase nos cães em áreas com alta prevalência da doença, podendo através de controle direto das pulgas em cães, fazer um controle indireto do parasita na população humana local (BEUGNET et al., 2015; DRYDEN et al., 2015).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tungíase

Inicialmente a tungíase foi descrita na América do Sul e no Caribe, a partir do descobrimento das Américas no século XV, quando surgiram os primeiros relatos da doença. Nos séculos seguintes o ectoparasita foi introduzido na África através dos navios que realizavam tráfico de escravos (HEUKELBACH et al., 2005). Atualmente há ocorrência na América do Sul, no Caribe e na África subsaariana, incluindo Madagascar (THIELECKE et al., 2013). As infestações desenvolvem-se em condições climáticas são favoráveis, mas se perpetuam em comunidades desfavorecidas que convivem intimamente com a pobreza, como nas periferias, favelas, vilas de pescadores, comunidades rurais e indígenas, especialmente em terrenos arenosos (HEUKELBACH et al., 2001; ARIZA et al., 2007; HARVEY et al., 2017).

A tungíase é caracterizada pela penetração cutânea e hipertrofia da pulga *T. penetrans* na pele do hospedeiro ao entrar em contato com o solo arenoso seco e contaminado (EISELE et al., 2003; HEUKELBACH et al., 2004; LEFEBVRE et al., 2011). As pulgas (fêmeas e machos) são hematófagas, no

entanto apenas as fêmeas adultas, já fecundadas, penetram na pele humana e dos animais domésticos ou selváticos, após se desenvolverem e ovopositarem, morrem *in situ* após o período de quatro a seis semanas (FELDMEIER et al., 2003; HEUKELBACH et al., 2005). Os principais reservatórios da *T. penetrans* incluem cães, gatos, porcos e roedores, que contribuem para manutenção da doença através da dispersão ambiental do ectoparasita, no entanto o cão é apontado como principal reservatório e um importante fator de risco para tungíase na América do Sul, já no continente africano é a espécie suína que assume esse papel (HEUKELBACH et al., 2004; HARVEY et al., 2017; MUTEBI et al., 2016).

No Brasil em uma comunidade desfavorecida no estado do Ceará a prevalência da tungíase apresentou taxa variando de 21 a 83% na população humana (WILCKE et al., 2002). Alguns estudos com cães também demonstram uma alta prevalência na espécie, como em uma das únicas regiões estudadas no estado da Bahia, cuja prevalência em cães infestados de uma comunidade pesqueira foi de 62% (HARVEY et al., 2017). Adicionalmente, em uma favela do Rio Grande do Norte os cães apresentaram prevalência de 47% para tungíase (BONFIM et al., 2010), e por fim, no estado do Ceará, na cidade de Fortaleza, a porcentagem de tungíase nos caninos de comunidade carente foi de 67% (HEUKELBACH et al., 2004). Já em um centro de zoonose do estado de Minas Gerais, a prevalência para tungíase em cães foi de 0,7%, apresentando uma baixa prevalência da doença, que pode ser justificada pela localização geográfica do estado e suas variações climáticas (HEUKELBACH et al., 2012). A incidência da doença em algumas localidades pode ser constante durante todos os períodos do ano, favorecendo sua dinâmica e, conseqüentemente, dificultando o controle (HARVEY et al., 2019), ou apresentar um pico de infestações no período seco (HEUKELBACH et al., 2005).

O parasita leva em média de 3 a 7 horas para realizar a penetração completa na pele de seu hospedeiro. E com cerca de dois a três dias após a sua incorporação, inicia-se o processo de hipertrofia abdominal da pulga, no qual o neossoma da pulga *T. penetrans* aumenta de tamanho, também ocorre a maturação seus ovos e a eliminação no ambiente; após esse período envolvem, culminando em morte de 4 a 6 semanas após a incorporação do parasita (EISELE et al., 2003; HARVEY et al., 2021).

As lesões causadas *T. penetrans* são comumente observadas na região periungeoal dos pés dos humanos ou das patas dos animais. Contudo, as lesões podem ocorrer em localizações ectópicas, como face, membros, pescoço, mamas e região genital, no entanto, esses locais de lesão são mais observados em animais, devido ao contato mais intrínseco com o ambiente contaminado (HEUKELBACH et al., 2004; LEFEBVRE et al., 2011), como evidenciado na figura 1. Em locais endêmicos é comum observar hospedeiros com múltiplas lesões cutâneas, o que diminui a qualidade de vida desses indivíduos e muitas vezes impossibilita a execução de atividades consideradas simples, como caminhar (FELDMEIER et al., 2003; JOSEPH et al., 2006; HARVEY et al., 2017). Muitas vezes essas lesões estão localizadas em clusters, que são lesões múltiplas e próximas, o que contribui para o agravamento de sinais clínicos locais como hiperemia, dor, edema, fissura, supuração, dentre outros (HEUKELBACH et al., 2004; ARIZA et al., 2007).

Figura 1. Diferentes localizações de lesões ectópicas causadas por *Tunga penetrans*.



Fig1. A) Lesões ectópicas causadas por *T. penetrans* em focinho de cão infestado; B) Múltiplas lesões ectópicas na mama de um cão; C) Detalhes de lesões ectópicas em mama de cadela; D) Lesões ectópicas em testículo de cão; E) Detalhes de lesão em cluster no testículo de um cão; F) Lesão ectópica em cotovelo de cão infestado por *T. penetrans*. Fonte:Arquivo pessoal.

O diagnóstico de tungíase é obtido clinicamente pela inspeção das lesões, uma vez que são bem características, além da manifestação dos sinais clínicos iniciais, como prurido, eritema e dor local, observados nas fases iniciais da doença (HEUKELBACH et al., 2001). O parasita pode ser identificado em cinco distintas etapas (figura 2), a denominada Classificação de Fortaleza. O estágio I é o *statu penetrandi*, fase em que a pulga realiza a incorporação na epiderme de seu hospedeiro. Após essa fase uma mancha cutânea avermelhada, com aproximadamente 1 mm de diâmetro, se desenvolve no local da penetração. No estágio II inicia-se o processo de hipertrofia, que ocorre de um a dois dias após a penetração, no qual poderá ser observada uma lesão nodular esbraquiçada. No estágio III, a hipertrofia é máxima e ocorre duas a três semanas após a penetração; nesse estágio a lesão é evidente, sendo possível observar um halo amarelado com um ponto engrecido ao centro da lesão, que corresponde ao

sistema reprodutor da fêmea. É nessa fase que ocorre hipertrofia máxima da pulga e a dispersão dos ovos no ambiente, é também nesse estágio que as lesões tornam-se mais doloridas, na qual os hospedeiros tem a sensação de um corpo estranho sob a pele. No estágio IV, que inicia-se entre 4 e 6 semanas após a penetração a lesão é recoberta com uma crostra amarronzada e o parasita involui até a morte. Por fim, no estágio V, é observada uma lesão circular, que corresponde à cicatriz residual (EISELE et al., 2003; HARVEY et al., 2021).

Nos estágios iniciais I, II e III as lesões são consideradas vitais, nos quais a pulga apresenta-se em uma fase de desenvolvimento ativo. Nos últimos estágios IV e V as lesões são descritas como avitais, pois a pulga está em fase de involução e morte, período que incia-se o processo cicatricial (ARIZA et al., 2007; HEUKELBACH et al., 2001). Durante as diferentes etapas das lesões vitais, complicações como infecções bacterianas secundárias, linfadenite, úlceras, gangrena e necrose tecidual podem estar presentes (FELDMEIER et al., 2002). Além disso, sequelas mais graves, como perda ou deformação de dígitos e unhas, e a necessidade de amputação dos membros afetados podem ocorrer, resultando em uma morbidade significativa (HEUKELBACH, 2005; COLLINS et al., 2009; THIELECKE et al., 2014). As manifestações clínicas nos cães e são semelhantes às que ocorrem nos humanos sendo a intervenção veterinária imediata necessária para mitigar as consequências a saúde dos animais acometidos (MUTEBI et al., 2016).

Figura 2. Os cinco estágios das lesões causadas por *T. penetrans* de acordo com a classificação de Fortaleza.

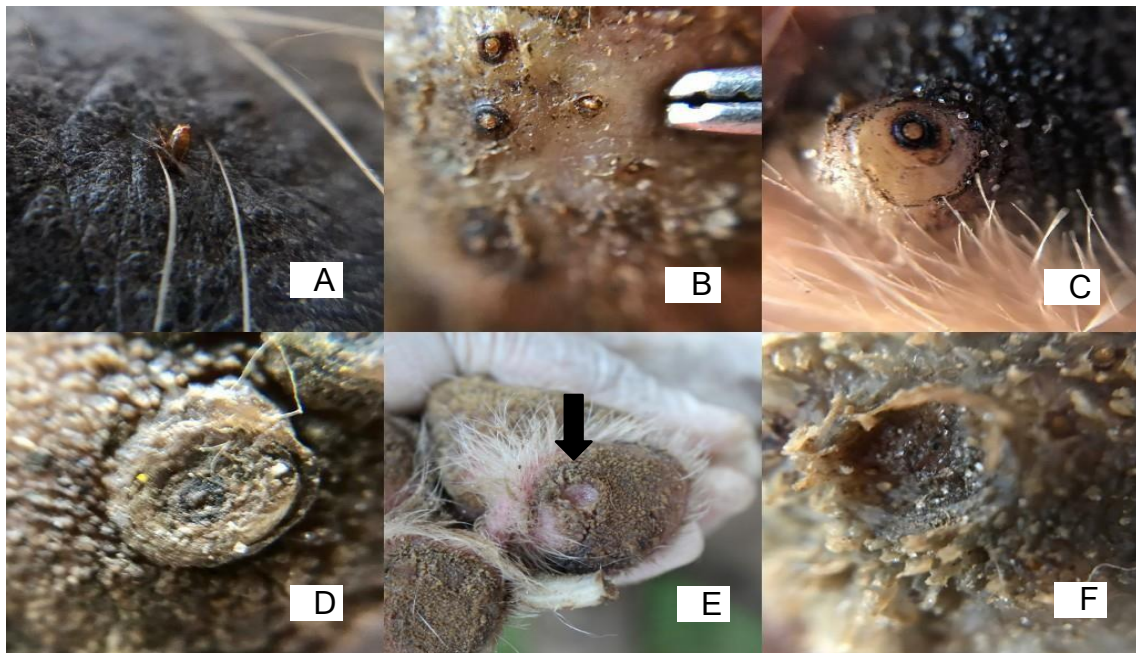


Fig 2. A) Penetração da pulga *T. penetrans* em coxim de cão infestado (estágio I); B) Mancha escura de cerca de 1 - 2 mm com uma área hiperêmica (estágio II); C) Mancha redonda, amarela, com um ponto escuro central, de cerca de 4 - 13 mm (estágio III); D) Lesões circulares, castanhas a pretas, rodeadas por tecido necrótico (estágio IV); E) Lesão em estágio IV após remoção do tecido necrótico superficial; F) Cicatriz residual após morte do ectoparasita (estágio V). Fonte: Arquivo pessoal

A extração manual do ectoparasita é um método de tratamento eficaz para a tungíase se realizada sob condições estéreis, em um ambiente hospitalar. Após a extração, a ferida deve ser tratada com antibioticoterapia tópica, afim de prevenir complicações (FELDMEIER; HEUKELBACH; et al., 2003; THIELECKE et al., 2013). Tal método é comumente empregado em pacientes humanos. No entanto, em cães infestados por *T. penetrans* instrumentos como agulhas, alfinetes, espinhos ou alicate são utilizados pelos tutores para remoção dos parasitas através de métodos não assépticos (HARVEY et al., 2017; MUTEBI et al., 2018). Geralmente esses utensílios apresentam-se afiados e contaminados, e o descarte incorreto desse material também contribui para manutenção da doença, uma vez que os ovos ficam nesses objetos e contaminam o ambiente (HEUKELBACH et al., 2001; FELDMEIER et al., 2014).

Além disso, os próprios cães também realizam a retirada das pulgas por meio da mutilação da região acometida através da mordedura (HARVEY et al., 2017).

A utilização desses objetos para extração do parasita pode resultar em infecção secundária por *Clostridium tetani*, agente causador do tétano (TONGE, 1989), além da transmissão de patógenos pelo sangue, como o vírus da hepatite B e C, e o vírus do HIV/AIDS, caso um único instrumento não estéril seja utilizado por diferentes indivíduos infestados (NORDIN et al., 2017). Além disso, em pacientes acometidos por múltiplas lesões, a remoção torna-se mais laboriosa (EISELE et al., 2003). Métodos inadequados são utilizados no tratamento da tungíase humana e animal são comumente aplicados nas comunidades endêmica, o que representam sérios riscos a saúde dos hospedeiros, isso ocorre pelo limitado conhecimento em relação a tungíase (MUTEBI et al., 2018).

Alguns tratamentos farmacológicos para a tungíase humana já foram testados, como a eficácia da ivermectina oral em humanos infestados (HEUKELBACH et al., 2004). No entanto, o estudo controlado randomizado conduzido com ivermectina oral em dose relativamente alta (2x300 µg / kg de peso corporal) não mostrou eficácia em comparação ao placebo (HEUKELBACH et al., 2004). Por outro lado, outro estudo relatou alguma eficácia da ivermectina tópica, metrifonato e tiabendazol em comparação com uma loção tópica utilizada como placebo em um grupo controle sem tratamento (HEUKELBACH et al., 2003). Estudos recentes mostraram que um repelente à base de óleo de coco, recomendado contra picadas de insetos, é altamente eficaz tanto na regressão do ectoparasita em indivíduos gravemente infestados, como em sua prevenção (ELSON et al., 2019).

Ensaio demonstraram a eficácia de NYDA®, uma dimeticona, substância antiplolho de uso tópico, para o tratamento e prevenção de tungíase em humanos (MILLER et al., 2020). Um dos estudos foi realizado no Quênia e outro em Uganda, no primeiro a eficácia foi de 78% e no segundo de 97%; a eficácia foi calculada em relação à viabilidade das pulgas após sete dias do tratamento (MILLER et al., 2019; NORDIN et al., 2017).

Com relação ao tratamento em cães, um estudo com essa espécie foi conduzido no Brasil para avaliar a eficácia da combinação de 10% de imidacloprida e 50% de permetrina (Advantix®), um repelente e parasiticida

comercial. O produto foi testado em 17 cães através de uma única aplicação tópica. Foram realizadas quatro avaliações, nos dias 7, 14, 21 e 28 do estudo, sendo que em todas as avaliações os cães apresentaram lesões vitais características de tungíase. Nos dias 7, 14 e 28, um total de 15 cães apresentaram lesões vivas; no dia 21, 14 dos 17 cães tinham lesões vitais de tungíase. Os resultados mostraram que houve controle da tungíase nos cães tratados quando comparado ao grupo controle, sem tratamento. Dessa forma, foi possível observar uma diminuição na quantidade de pulga do grupo tratado em relação ao grupo controle, visto que a maioria dos cães tratados continuou a apresentar lesões vitais após o tratamento (KLIMPEL et al., 2005). Atualmente não existe nenhum tratamento ou prevenção medicamentosa eficaz para a infestação por *T. penetrans* em cães disponível em mercado comercial para animais (EISELE et al., 2003; THIELECKE et al., 2014).

A tungíase é uma doença negligenciada pelas autoridades de saúde no Brasil e esse fator torna o controle da enfermidade um árduo desafio para as comunidades atingidas no país, uma vez que não existem recursos disponíveis para investir no controle da doença (WILCKE et al., 2002; HEUKELBACH, 2005). Atualmente não existe medicação com eficiência comprovada, tão pouco medidas profiláticas eficientes para tungíase animal (THIELECKE et al., 2013). Nas comunidades pobres o controle ideal da tungíase exige múltiplas ações efetivas, através de simples ações de cuidado e higiene pela população até o uso de substâncias inseticidas para controle de potenciais reservatórios e disseminadores da doença (FELDMEIER et al., 2014). A indicação de um princípio ativo que possa auxiliar no controle e tratamento da tungíase nos principais reservatórios dessa zoonose, os cães, diminuirá a contaminação ambiental através da menor dispersão dos ovos que são eliminados por esses hospedeiros constantemente (HEUKELBACH et al., 2004) e, conseqüentemente, esse avanço significaria o controle indireto da tungíase na população humana.

2.2 Princípio ativo fluralaner

O fluralaner é um acaricida e inseticida sistêmico pertencente à família das isoxazolininas, uma nova classe de antiparasitários que fornece uma longa

eficácia após sua administração em animais (GASSEL et al., 2014; WILLIAMS et al., 2014). O fármaco tem formulação comercial oral, caracterizada por comprimidos palatáveis na dosagem equivalente a 25-56 mg/kg de peso corporal para cães. Alguns estudos mostram que uma única dose de fluralaner fornece proteção e tratamento eficaz contra algumas espécies de pulgas (*Ctenocephalides felis* e *Ctenocephalides canis*) e carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes holocyclus*, *Dermacentor reticulatus* e *Dermacentor variabilis*) por até 12 semanas em cães. O longo período de atividade da medicação reduz o risco de doenças transmitidas por ectoparasitas quando comparado com outras substâncias ativas de uso mensal (ROHDICH et al., 2014; DRYDEN et al., 2015; FISARA et al., 2019).

Esse fármaco tem um potente mecanismo de ação que bloqueia os canais de cloreto dependentes do ácido γ -aminobutírico (GABA) e glutamato em neurônios, interrompendo a condução dos estímulos inibitórios e causando, nos parasitas, excitação exacerbada, paralisia e morte. Esse inseticida apresenta uma seletividade significativa pelos neurônios de insetos em relação aos neurônios de mamíferos (OZOE et al., 2010; DRYDEN et al., 2016). Um estudo demonstrou a segurança do tratamento sistêmico com fluralaner ao observar possíveis impactos na saúde de cães pela administração por via oral repetida e em uma dose cinco vezes maior do que a dose máxima recomendada, em múltiplas sobredoses. Os resultados obtidos demonstraram que os cães não apresentaram nenhum efeito adverso ou alteração que pudesse ser avaliada através da observação clínica e avaliação clínico-patológica em cães com no mínimo 2 kg de peso corporal e com idade maior que 2 meses (WALTHER et al., 2014).

Após a administração oral a medicação é rapidamente absorvida, as concentrações plasmáticas máximas são atingidas em aproximadamente 24 horas (GASSEL et al., 2014). Estudo com o fluralaner no combate à *Ctenocephalides felis* demonstrou que o início de seu período de ação após o tratamento foi de uma hora (TAENZLER et al., 2014). O fluralaner apresenta longa meia-vida de eliminação, longo tempo de permanência média, volume aparente de distribuição relativamente elevado, e uma taxa de depuração baixa. Estas características farmacocinéticas ajudam a explicar a atividade prolongada

de fluralaner contra pulgas e carrapatos em cães após uma única dose administrada por via oral (KILP et al., 2014). O fármaco apresenta concentrações mais elevadas na tecido adiposo, seguido do fígado, rim e músculo, sendo sua principal via de eliminação a excreção através das fezes (OZOE et al., 2010). O fluralaner é considerado um tratamento inovador, altamente eficaz e seguro para utilização com finalidade ectoparasiticida em cães (DRYDEN et al., 2015).

Em um estudo, no qual o fluralaner foi testado para avaliação do seu efeito ovicida, larvicida e adulticida *in vitro*, na espécie de pulga *C. felis* em doses subinseticidas entre 0,09 e 50,0 ng/mL associada ao sangue de ovelha desfibrinado, foi observada potente ação inibitória na reprodução das pulgas, assim como na ovoposição, que foi cessada a partir das menores doses de fluralaner utilizadas no experimento. No estudo não foi observado nenhum efeito ovicida, no entanto o princípio ativo apresentou atividade larvicida em níveis muito baixos de fluralaner a partir de 6,25 ng/mL. Em relação às avaliações adulticidas, no dia 5 de avaliação ainda existiam pulgas vivas em todas as dosagens testadas (WILLIAMS et al., 2014).

Diversos estudos já foram publicados testando e comparando a eficácia do fluralaner com outros ectoparasiticidas para o combate à pulga *C. felis* (BEUGNET et al., 2015; DRYDEN et al., 2015), e a diferentes espécies de carrapatos (WENGENMAYER et al., 2014), com resultados satisfatórios. Um ensaio clínico comparou o uso de fluralaner por via oral e administração com dose única ao tratamento tópico e mensal com fipronil. Os autores concluíram que após três meses a eficácia entre os fármacos foi semelhante para carrapatos e o fluralaner apresentou eficácia superior para pulgas (ROHDICH et al; 2014). Adicionalmente, pesquisadores relatam que o fluralaner administrado em conjunto com a alimentação em cães, apresenta uma disponibilidade plasmática 2,1 vezes maior, do que quando administração em jejum, ou seja o comprimido ofertado concomitante a alimentação aumenta a biodisponibilidade sistêmica do fármaco (WALTHER et al., 2014).

E se tratando de controle ambiental de ectoparasitas, foi realizado um estudo para avaliação da eficácia do fluralaner em dose clínica mínima no controle de pulgas (*C. felis*) em um ambiente doméstico simulado. Sua eficácia foi de 100% durante todos os dias do estudo, exceto no primeiro dia, no qual a

eficácia foi de 96% (RANJAN et al., 2018). Em relação à resistência das pulgas e carrapatos ao fluralaner, um trabalho realizado não identificou nenhuma causa de possíveis falhas da eficácia do inseticida/acaricida relacionada ao seu mecanismo de ação. Qualquer falha na eficácia deve ser relacionada à deficiência do tratamento, que pode ser por erro na administração ou na produção de resposta individual do animal (COLES; DRYDEN, 2014).

Com relação à segurança do uso do fluralaner em animais que apresentam hipersensibilidade a alguns ectoparasiticidas, um estudo envolvendo cães de raças dolicocefálicas foi desenvolvido para avaliar possíveis reações ao tratamento com fluralaner e nenhum evento adverso foi observado subsequente ao tratamento de Collies com fluralaner em dose clínica três vezes maior do que a esperada (WALTHER et al., 2014). Pesquisadores concluíram, ainda, que o fluralaner é seguro para utilização em cães reprodutores, gestantes e em lactação (DRYDEN et al., 2016).

Além das vantagens acima assinaladas para o uso do fluralaner, outro fator positivo e importante para sua escolha com relação aos demais ectoparasiticidas é seu efeito prolongado, uma vez que foi demonstrado que a redução na frequência do tratamento pode ser uma ferramenta para um controle mais efetivo (WALTHER et al., 2014). Outra vantagem da ação sistêmica de fluralaner está relacionada por não alterar sua eficácia quando o cão é exposto ao efeito da chuva, ou ações humanas como o banho (RANJAN et al; 2018).

Com base nessa revisão de literatura, observa-se que a tungíase é uma doença que assola países subdesenvolvidos, em especial comunidades que convivem com a pobreza. Infelizmente, até o momento não existe uma medicação profilática ou um tratamento eficaz para a doença em cães. No entanto, este estudo com o princípio ativo fluralaner gera uma nova perspectiva de controle da doença em cães, que é considerado um dos principais reservatórios do parasita. O ensaio clínico descrito nessa dissertação buscou controlar as pulgas e sua dispersão no ambiente através dos comprimidos palatáveis de Bravecto™ (fluralaner) e conseqüentemente, apesar de não ser um dos objetivos da pesquisa, indiretamente controlar os casos de tungíase em humanos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIZA, Liana; SEIDENSCHWANG, Martin; BUCKENDAHL, John; GOMIDE, Marcia; FELDMEIERS, Hermann; HEUKELBACH, Jörg. Tungiasis: a neglected disease causing severe morbidity in a shantytown in Fortaleza, State of Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 63-67, 2007.

BEUGNET, Frederic; LIEBENBERG, Julian; HALOS, Lenaig. Comparative speed of efficacy against *Ctenocephalides felis* of two oral treatments for dogs containing either afoxolaner or fluralaner. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3-4, p. 297-301, 2015.

BONFIM, William; CARDOSO, Mirian; CARDOSO, Valbérico; ANDREAZZE Ricardo. Tungíase em uma área de aglomerado subnormal de Natal-RN: prevalência e fatores associados. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, n. 4, p. 379-388, 2010.

COLES, Tad B.; DRYDEN, Michael W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2014.

COLLINS, George; MCLEOD, Thomas; KONFOR, Njilah; LAMNYAM, Clarisse; NGARKA, Leo; NJAMNSHI, Nfor Leo. Tungiasis: A neglected health problem in rural cameroon. **International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine and Public Health**, v. 1, n. 1, p. 2-10, 2009.

DONGUS, Heide; MEYER, Leon; ARMSTRONG, Rob. Water immersion of dogs close to the time of topical fluralaner treatment does not reduce efficacy against a subsequent experimental challenge with *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato). **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 9-11, 2017.

DRYDEN, Michael; SMITH, Vicki; BENNETT, Tashina; MALTH, Lisa; KALLMAN, James; HEANEY, Kathleen; SUN, Fangshi. Efficacy of fluralaner flavored chews

(Bravecto®) administered to dogs against the adult cat flea, *Ctenocephalides felis felis* and egg production. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, 2015.

DRYDEN, Michael; CANFIELD, Michael; KALOSY, Kimberly; SMITH, Amber; CREVOISERAT, Lisa; MCGRADY, Jennifer; FOLEY, Kaitlin; GREEN, Kathryn; TEBALDI, Chantelle; SMITH, Vicki; BENNETT, Tashina; HEANEY, Kathleen; MATH, Lisa; ROYAL, Christine; SUN, Fangshi. . Evaluation of fluralaner and afoxolaner treatments to control flea populations, reduce pruritus and minimize dermatologic lesions in naturally infested dogs in private residences in west central Florida USA. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2016.

EISELE, Margit; HEUKELBACH, Jorg; VAN MARCK, Eric; MEHLHORN, Heinz; MECKES, Oliver; FRANCK, Sabine; FELDMEIR, Hermann. Investigations on the biology, epidemiology, pathology and control of *Tunga penetrans* in Brazil: I. Natural history of tungiasis in man. **Parasitology Research**, v. 90, n. 2, p. 87-99, 2003.

EISELE, Margit; HEUKELBACH, Jorg; VAN MARCK, Eric; MEHLHORN, Heinz; MECKES, Oliver; FRANCK, Sabine; FELDMEIER, Hermann. High prevalence of intestinal infections and ectoparasites in dogs, Minas Gerais State (southeast Brazil). **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1913-1921, 2012.

ELSON, Lynne; RANDU, Kithi; FELDMEIER, Hermann; FILLINGER, Ulrike. Efficacy of a mixture of neem seed oil (*Azadirachta indica*) and coconut oil (*Cocos nucifera*) for topical treatment of tungiasis. A randomized controlled, proof-of-principle study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 11, p. 1-19, 2019.

FELDMEIER, Hermann; HEUKELBACH, Jorg; EISELE, Margit; QUEIROZ MARILAC, Meireles. Bacterial superinfection in human tungiasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 7, p. 559-564, 2002.

FELDMEIER, Hermann; HEUKELBACH, Jorg; EISELE, Margit; QUEIROZ, Souza; MARILAC, Meireles. Severe tungiasis in underprivileged communities:

Case series from Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 949-955, 2003.

FELDMEIERS, Hermann; HEUKELBACK, Jorg; UGBOMOIK, Uadi, SENTONGO, Elizabeth; MBABAZI, Pamela; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, Georg; KRANTZ, Ingela. Tungiasis—A Neglected Disease with Many Challenges for Global Public Health. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

FISARA, Petr; GUERINO, Frank; SUN, Fangshi. Efficacy of a spot-on combination of fluralaner plus moxidectin (Bravecto® Plus) in cats following repeated experimental challenge with a field isolate of *Ctenocephalides felis*. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2019.

GASSEL, Michael WOLF, Christian, NOACK, Sandra; WILLIAMS, Heike; ILG, Thomas. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and l-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, n. 1, p. 111-124, 2014.

HARVEY, Tatiani; HEUEUKELBACH, Jorg, ASSUNÇÃO, Máira Siles FERNANDES, Thalna Magalhães; DA ROCHA Christiane Maria; BARCELLOS, Magalhães; CARLOS, Renata Santiago Alberto. Canine tungiasis: High prevalence in a tourist region in Bahia state, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 139, p. 76-81, 2017.

HARVEY, Tatiani Vitor; HEUEUKELBACH, Jorg, ASSUNÇÃO, Máira Siles FERNANDES, Thalna Magalhães; DA ROCHA Christiane Maria; BARCELLOS, Magalhães; CARLOS, Renata Santiago Alberto. Seasonal variation and persistence of tungiasis infestation in dogs in an endemic community, Bahia State (Brazil): longitudinal study. **Parasitology Research**, v. 118, n. 6, p. 1711-1718, 2019.

HARVEY, Tatiane Vitor; FREIRE, Zelina Santos; SANTOS, Katharine Costa; JESUS, Anderson Vieira; GUEDES, Paula Elisa Brandão; SEVÁ, Anaia da

Paixão; BORGES, Fernando De Almeida; CARLOS, Renata Santiago Alberto. Clinical and macroscopic morphological features of canine tungiasis. **Parasitology Research** v.120, n. 3, p. 807-818, 2021.

HEUKELBACH, Jorg; WILCKE, Thomas; FELDMIEIER, Hermann. The animal reservoir of *Tunga penetrans* in severely affected communities of north-east Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 4, p. 329-335, 2004.

HEUKELBACH, Jorg; EISELE, Margit; Jackson A; FELDMIEIER, Hermann. Topical treatment of tungiasis: A randomized, controlled trial. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, n. 7, p. 743-749, 2003.

HEUKELBACH, Jorg. Invited review - Tungiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 47, n. 6, p. 307-313, 2005.

HEUKELBACH, Jorg. Revision on tungiasis: Treatment options and prevention. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.4, n. 1, p. 151-157, 2006.

HEUKELBACH, Jorg; WILCKE, Thomas; HARMS, Gundel; FELDMIEIER, Hermann. Seasonal variation of tungiasis in an endemic community. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 2, p. 145-149, 2005.

HEUKELBACH, Jorg; SALES DE OLIVEIRA, Fabíola; ARAÚJO; Hesse, Gerhard; FELDMIEIER, Hermann. Tungiasis: A neglected health problem of poor communities. **Tropical Medicine and International Health**, v.6, n. 4, p. 267-272, 2001.

HEUKELBACH, Jorg; FRANCK, Sabine; FELDMIEIER, Hermann. Therapy of tungiasis: A double-blinded randomized controlled trial with oral ivermectin. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 873-876, 2004.

JOSEPH, J. Keith; BAZILE, Junior; MUTTER, Justin; SHIN, Sonya; RUDDLE, Andrew; IVERS, Louise; LYON, Evan; FARMER, Paul. Tungiasis in

rural Haiti: a community-based response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 10, p. 970-974, 2006.

KLIMPEL, S.; MEHLHORN, H; HEUKELBACH, J.; FELDEKMEIER H; MENCKE, N. Field trial of the efficacy of a combination of imidacloprid and permethrin against *Tunga penetrans* (sand flea, jigger flea) in dogs in Brazil. **Parasitology Research**, v. 97, n. SUPPL. 1, p. 113-119, 2005.

LEFEBVRE, M. CAPITO, C; DURANT, C; HERVEIR, B; GROSSI, O. Tungiasis: A poorly documented tropical dermatosis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 41, n. 9, p. 465-468, 2011.

MATIAS, Ricardo Soares. Epidemia de tungiase no Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, n. 3, p. 137-142, 1989.

MILLER, Hollman; TRUJILLO-TRUJILLO, Julián; MUTEBI, Francis; FELDMEIER, Hermann. Efficacy and safety of dimeticiones in the treatment of epidermal parasitic skin diseases with special emphasis on tungiasis:an 24 evidence-based critical review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 170-177, 2020.

MILLER, Hollman; OCAMPO, Jovana; AYALA, Alvaro; TRUJILLO, Julian; FELDMEIER, Hermann. Very severe tungiasis in amerindians in the amazon lowland of Colombia: A case series. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 1-19, 2019.

MOLYNEUX, David H.; SAVIOLI, Lorenzo; ENGELS, Dirk. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 312-325, 2017.

MUTEBI, Francis; KRUCKEN, Jurgen; VON SAMSON- HIMMELSTJERNA, Georg; WAISWA, Charles; MENCKE, Norbert; ENEKU, Wilfred; ANDREW, Tamale FELDMEIER, Hermann. Animal and human tungiasis-related knowledge

and treatment practices among animal keeping households in Bugiri District, South-Eastern Uganda. **Acta Tropica**, v. 177, n. August 2017, p. 81-88, 2018.

MUTEBI, Francis; KRUCKEN, Jurgan; FELDMEIER, Hermann; WAISWA, Charles; Mencke, Norbert; MENCKE, Norbert; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, Georg. Tungiasis-associated morbidity in pigs and dogs in endemic villages of Uganda. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2016.

MUTEBI, Francis; KRUCKEN, Jurgan; FELDMEIER, Hermann; WAISWA, Charles; Mencke, Norbert; MENCKE, Norbert; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, Georg; Sentongo, Elizabeth. Animal Reservoirs of Zoonotic Tungiasis in Endemic Rural Villages of Uganda. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 9, n. 1, p. 1-23, 2015.

NORDIN, Per; THIELECKE, Marlene; NGOMI, Nicholas; MUDANGA, George; KRANTZ, Ingela; FELDMEIER, Hermann. Treatment of tungiasis with a two component dimeticone: A comparison between moistening the whole foot and directly targeting the embedded sand fleas. **Tropical Medicine and Health**, v. 45, n. 1, p. 13-15, 2017.

NYANGACHA, Ruth Monyenye; DAVID, Oyieke; FLORENCE, Ochwoto, MISSIANI; Korir, RICHARD, Ngetich, RONALD Kiprotich; NGINYA, Gladys; MAKWAGA, Olipher; BII, Christine; MWITARI, Peter; TOLO, Festus Secondary bacterial infections and antibiotic resistance among tungiasis patients in Western, Kenya. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1-11, 2017.

OZOE, Yoshihisa; ASAH, Miho; OZOE, Fumiyo; NAKAHIRA, Kunimitsu; MITA, Takeshi. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 1, p. 744-749, 2010.

RANJAN, Sivaja; YOUNG, David; SUN, Fangshi. A single topical fluralaner application to cats and to dogs controls fleas for 12 weeks in a simulated home environment. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2018.

ROHDICH, Nadja; ROEPKE, Rainer Ka; ZSCHIESCHE, Eva. A randomized, blinded, controlled and multi-centered field study comparing the efficacy and safety of Bravecto™ (fluralaner) against Frontline™ (fipronil) in flea- and tickinfested dogs. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 2-6, 2014.

THIELECKE, Marlene; RAHARIMANGA, Vaomalala; ROGIER, Christophe; STAUSS-GRABO; Manuela; RICHARD, Vincent; FELDMIEIER, 25 Hermann
Prevention of Tungiasis and Tungiasis-Associated Morbidity Using the Plant-Based Repellent Zanzarin: A Randomized, Controlled Field Study in Rural Madagascar. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, 2013.

THIELECKE, Marlene NORDIN, Per; NGOMI, Nicholas; FELDMIEIER, Hermann
Treatment of Tungiasis with Dimeticone: A Proof-of-Principle Study in Rural Kenya. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

TONGE, B L. Tetanus from chigger flea sores. *J Trop Pediatr*, v. 35, n. April, p. 1989, 1989. WALTHER, Feli M.; PAUL, Allan J.; ALLAN, Mark J.; ROEPKE, Rainer Ka; NUERNBERGER, Martin C.. Safety of fluralaner, a novel systemic antiparasitic drug, in MDR1(-/-) Collies after oral administration. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2014.

WALTHER, Feli M.; PAUL, Allan J.; ALLAN, Mark J.; ROEPKE, Rainer Ka; NUERNBERGER, Martin C. Safety of fluralaner chewable tablets (Bravecto™), a novel systemic antiparasitic drug, in dogs after oral. **Parasites and Vectors**, v.7, n. 1,p. 1-6, 2014.

WENGENMAYER, Christina WILLIAMS, Heike; ZSCHIESCHE, Eva; MORITZ, Andreas; LANGENSTEIN, Judith; ROEPKE, Rainer K.A., HECKEROTH, Anja R.. The speed of kill of fluralaner (Bravecto™) against Ixodes ricinus ticks on dogs. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-5, 2014.

WILCKE, Thomas; HEUKELBACH, Jörg; CÉSAR SABÓIA MOURA, Rômulo; REGINA SANSIGOLO KERR-PONTES, Lúgia; FELDMIEIER, Hermann. High

prevalence of tungiasis in a poor neighbourhood in Fortaleza, Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 83, n. 3, p. 255-258, 2002.

WILLIAMS, Heike; YOUNG, David R., QURESHI, Tariq; ZOLLER, Hartmut; HECKEROTH, Anja R. Fluralaner, a novel isoxazoline, prevents flea 26 (*Ctenocephalides felis*) reproduction in vitro and in a simulated home environment. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 4-9, 2014.

ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos serão apresentados em forma de artigo científico, o qual será submetido ao periódico Plos Neglected Tropical Diseases. Desta forma, a formatação do manuscrito aqui apresentado seguirá as normas do periódico.

Artigo Original

Avaliação da eficácia dos comprimidos mastigáveis de fluralaner (Bravecto®) contra *Tunga penetrans* em cães: Um estudo a campo, controlado, randomizado e duplo cego em comunidade endêmica do Brasil

Eficácia de fluralaner (Bravecto®) contra *Tunga penetrans* em cães

Katharine Costa dos Santos¹, Rafael Marin Chiummo², Paula Elisa Brandão Guedes¹, Tatiani Vitor Harvey¹, Anderson Vieira de Jesus¹, Anaiá da Paixão Sevá¹, Joana Thaisa Santos de Oliveira¹, Zelina dos Santos Freire³, Georg Samson-Himmelstjerna⁴, Jürgen Krücken⁴, Fernando de Almeida Borges³, Renata Santiago Alberto Carlos¹

¹ UESC, Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Ilhéus, Bahia, Brasil.

²MSD, Animal Health Innovation GmbH, Schwabenheim, Alemanha.

³UFMS, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴FUBERLIN, Universidade Livre de Berlim, 2 Instituto de Parasitologia e Medicina Veterinária Tropical, Berlim, Alemanha.

Autor Correspondente:

E-mail: rsacarlos@uesc.br (RS)

Contribuição dos Autores

Conceituação: Katharine Costa dos Santos, Paula Elisa Brandão Guedes, Tatiani Vitor Harvey, Fernando de Almeida Borges, Renata Santiago Alberto Carlos.

- 30 **Curadoria de dados:** Katharine Costa dos Santos, Paula Elisa Brandão
31 Guedes, Tatiani Vitor Harvey, Renata Santiago Alberto Carlos.
- 32 **Análise formal:** Katharine Costa dos Santos, Anaiá da Paixão Sevá, Renata
33 Santiago Alberto Carlos.
- 34 **Investigação:** Katharine Costa dos Santos, Paula Elisa Brandão Guedes,
35 Tatiani Vitor Harvey, Anderson Vieira de Jesus, Joana Thaisa Santos de
36 Oliveira, Zelina dos Santos Freire, Renata Santiago Alberto Carlos.
- 37 **Metodologia:** Georg Samson-Himmelstjerna, Jürgen Krücken Fernando de
38 Almeida Borges, Renata Santiago Alberto Carlos.
- 39 **Administração do projeto:** Rafael Marin Chiummo, Georg Samson-
40 Himmelstjerna, Jürgen Krücken Fernando de Almeida Borges, Renata
41 Santiago Alberto Carlos.
- 42 **Supervisão:** Rafael Marin Chiummo, Georg Samson-Himmelstjerna, Fernando
43 de Almeida Borges, Renata Santiago Alberto Carlos.
- 44 **Validação:** Paula Elisa Brandão Guedes, Tatiani Vitor Harvey, Renata
45 Santiago Alberto Carlos.
- 46 **Visualização:** Katharine Costa dos Santos, Renata Santiago Alberto Carlos.
- 47 **Escrita:** Katharine Costa dos Santos, Paula Elisa Brandão Guedes, Renata
48 Santiago Alberto Carlos.
- 49 **Escrita, revisão e edição:** Katharine Costa dos Santos, Paula Elisa Brandão
50 Guedes, Tatiani Vitor Harvey, Fernando de Almeida Borges, Renata Santiago
51 Alberto Carlos.

52

53

54

55

56

57

RESUMO

58

59 **Introdução.** A tungíase é uma zoonose caracterizada por lesões cutâneas
60 causadas pela penetração da pulga *Tunga penetrans* na pele do hospedeiro,
61 especialmente em cães oriundos de comunidades pobres. O presente ensaio
62 clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo visou determinar a
63 eficácia terapêutica e residual do princípio ativo fluralaner em cães naturalmente
64 infestados com *T. penetrans*. **Metodologia / Principais conclusões.** Foram
65 avaliados 62 cães do Povoado da Juerana, Bahia, Brasil, divididos em Grupo
66 Tratamento (GT), que recebeu o fluralaner na dose de 25 a 56 mg/kg, e Grupo
67 Controle (GC) que não recebeu tratamento, ambos com 31 animais. Foram
68 realizadas visitas nos dias 0 (inclusão e tratamento), + 7 (± 2), + 14 (± 2), +21 (\pm
69 2), +28 (± 2), + 60 (± 7), +90 (± 7), +120 (± 7), +150 (± 7), nas quais foram
70 realizados exames clínicos e avaliação parasitológica da pele nos cães. As
71 lesões foram estadiadas conforme classificação de Fortaleza, documentadas, e
72 um escore de gravidade para tungíase canina (SCADT) foi empregado para
73 avaliação clínica dos animais. A eficácia primária foi baseada na porcentagem
74 de cães livres do parasita após o tratamento, o GT apresentou superioridade
75 significativa ($p < 0,025$) em comparação ao GC do dia +7 até ao dia +120. Entre
76 o +21 e +60, todos os cães do GT apresentaram-se livres das pulgas. A eficácia
77 secundária avaliada com base no número de pulgas vivas foi superior a 90% do
78 dia +7 ao +90 para contagem de pulgas, e a comparação da gravidade avaliada
79 para tungíase canina aguda mostrou uma diferença significativa entre os grupos
80 do dia +7 ao +120 ($p < 0,05$). **Conclusão.** Através desses resultados observou-
81 se, que uma única administração do comprimido mastigável Bravecto® para

82 cães é eficaz para controlar e prevenir pulgas *T.penetrans* por 120 dias. Não
83 houve reação adversa associada a administração do fluralaner no GT.

84

85

RESUMO DO AUTOR

86 A tungíase é uma doença que acomete humanos e animais em contato com o
87 solo arenoso, seco e contaminado pela pulga de areia, especialmente onde as
88 condições de vida são precárias e o acesso a saúde básica é limitado. O cão é
89 considerado o principal reservatório e disseminador dessas pulgas na América
90 do Sul, eles penetram na pele do hospedeiro, causando graves lesões. Durante
91 esse ensaio clínico testamos a eficácia de fluralaner no tratamento e prevenção
92 contra a tungíase em cães a campo em uma área endêmica do Brasil.
93 Verificamos a eficácia do fármaco através dos cães livres das pulgas nas
94 avaliações de pele e a relação do número de pulgas vivas com os sinais clínicos
95 agudos associados à tungíase após o tratamento. O princípio ativo mostrou-se
96 100% eficaz da terceira à sexta semana de avaliação do tratamento e ofereceu
97 proteção para os cães contra a tungíase durante o período de estudo, uma vez
98 que eliminou as pulgas vivas e impediu a reinfestação desses animais. Nós
99 concluímos que o fluralaner é uma nova perspectiva para controlar a dinâmica
100 da doença através do tratamento de cães infestados.

101

102

INTRODUÇÃO

103 A tungíase, popularmente conhecida no Brasil como a doença do bicho
104 de pé, é uma ectoparasitose zoonótica caracterizada pela penetração e
105 hipertrofia das pulgas fêmeas da espécie *Tunga penetrans* no tecido cutâneo de
106 hospedeiro humano ou animal em contato com solo contaminado [1,2]. A doença

107 tem ocorrência na América do Sul, Caribe e África Subsaariana, abrangendo
108 Madagascar [3], e atinge milhões de pessoas, especialmente aqueles que
109 convivem com a pobreza, como nas periferias, favelas, vilas de pescadores,
110 populações rurais e indígenas [4,5].

111 Após o período de penetração, que pode variar de minutos a algumas
112 horas, as pulgas desenvolvem-se, maturam e liberam seus ovos no ambiente e
113 entre 4 e 6 semanas morrem *in situ* [6,7]. Entretanto, durante a fase que
114 antecede sua morte, as pulgas causam dor e prurido a seus hospedeiros, uma
115 vez que a incorporação da mesma provoca uma inflamação severa, que na
116 maioria das vezes é complicada por infecções bacterianas secundárias [8,9], que
117 podem resultar em graves sequelas, como perda ou deformação de dígitos e
118 membros acometidos [10]. Assim, os sinais clínicos ocasionados pela tungíase
119 diminuem a qualidade de vida de seus hospedeiros, refletindo diretamente em
120 seu bem-estar [11]. As fases de desenvolvimento da lesão, bem como as
121 alterações clínicas decorrentes da tungíase, apresentam similaridades entre
122 pacientes humanos e caninos acometidos [12].

123 No Brasil, em uma comunidade desfavorecida, a prevalência da tungíase
124 humana apresentou taxa de prevalência variando de 21 a 83% [10], já em cães
125 infestados em áreas endêmicas do Nordeste do Brasil, a prevalência foi de 62%
126 em uma comunidade pesqueira do estado da Bahia [5], 67% em favela no Ceará
127 [12], e 47% em uma favela situada no Rio Grande do Norte [13]. Esses
128 resultados demonstram significativa participação dos cães na dinâmica da
129 tungíase, visto que são perpetuadores das pulgas no ambiente. A incidência da
130 doença pode ser constante durante todos os períodos do ano em locais com
131 clima tropical, o que dificulta o controle da doença nas comunidades acometidas,

132 [14], ou apresentar um pico de infestações na período seco, concentrando os
133 casos nesse período [15].

134 A manutenção da tungíase nas áreas endêmicas ocorre através dos
135 principais hospedeiros reservatórios da *T. penetrans*, que incluem cães, gatos,
136 porcos e roedores, que contribuem para a dispersão da doença por meio da
137 eliminação dos ovos da pulga no ambiente. O cão é apontado como principal
138 reservatório e um importante fator de risco para tungíase nesses locais [12,13].

139 Devido à ação sistêmica e duradora do comprimido palatável de fluralaner
140 (Bravecto®) em cães para combate a outras espécies de ectoparasitas [16],
141 este oferece a oportunidade para o controle e tratamento de tungíase em cães,
142 visto que não existe tratamento comercialmente disponível com eficácia
143 comprovada contra *T.penetrans* nesses animais. O controle da doença na
144 espécie canina pode contribuir indiretamente para a diminuição da zoonose na
145 população humana. O presente ensaio clínico buscou verificar se uma única
146 administração do comprimido palatável de Bravecto® apresentava eficácia
147 inseticida significativa no grupo de cães tratados para *T. penetrans* em relação
148 aos não tratados, sob condições de campo, no qual foi verificada uma alta
149 eficácia do produto em relação ao tratamento da doença em cães.

150150

151 **MATERIAIS E METODOS**

152 Considerações éticas

153 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da
154 Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus- Bahia, Brasil, sob o
155 número 020/2019. O estudo foi conduzido, ainda, considerando os princípios da
156 “Good clinical practice” VICH GL9 (GCP) adotada pelo Comitê dos

157 Medicamentos para Uso Veterinário (CVMP), Agência Europeia de
158 Medicamentos (EMA), em Junho de 2000 (CVMP / VICH / 595/98-Final).

159

160 Área e população de estudo

161 O estudo foi conduzido na comunidade rural endêmica chamada Juerana,
162 do Estado da Bahia [17]. O povoado está localizado na região turística da Costa
163 do Cacau, a cerca de 640m do Oceano Atlântico. As temperaturas médias anuais
164 do município variam entre 22 e 25° C [18]. O regime pluviométrico é regular, com
165 abundantes chuvas distribuídas ao longo do ano. A área de estudo foi descrita
166 anteriormente como uma região com alta prevalência de tungíase em cães
167 durante todas as estações do ano [5].

168 A população de estudo foi composta por 62 cães com tungíase ativa,
169 caracterizada pela presença de ao menos uma lesão cutânea viável classificada
170 no estágio II ou III de Fortaleza. Os animais após avaliação clínica foram
171 considerados hígidos, tinham idade variando entre 4 meses e 14 anos de idade,
172 eram de ambos os sexos, sem raça definida, não castrados, apresentaram peso
173 médio entre 2,2 e 31,3 kg. Não havia nenhum animal gestante.

174 Durante todo o estudo os cães permaneceram sob os cuidados de seus
175 tutores e mantiveram suas rotinas habituais de se movimentarem livremente pelo
176 povoado onde foi conduzido o estudo. A pesquisa foi realizada do dia 14 de
177 novembro de 2019 ao dia 16 de abril de 2020.

178

179 Design do estudo

180 O ensaio clínico a campo foi controlado negativamente, randomizado e
181 cego. O local de estudo foi selecionado devido à disponibilidade de animais,

182 descrito anteriormente por Harvey e colaboradores (2007) como um local de alta
183 prevalência da doença em cães.

184 No dia 0 de estudo foi realizada a inclusão do animal ao grupo
185 experimental e sua identificação eletrônica individual, através de um microchip
186 com um código numérico. Também foi registrado o histórico do cão em conjunto
187 com o preenchimento do termo de consentimento pelo tutor. Logo após foi
188 realizado exame físico geral para atestar o estado geral do animal, assim como
189 a avaliação de gravidez (critério de exclusão) e exame parasitológico de pele.

190 Durante o período de tratamento experimental os 62 cães incluídos foram
191 divididos em dois grupos, cada um contendo 31 animais, sendo um grupo
192 tratamento (GT), cujos cães receberam uma única administração do comprimido
193 mastigável de Bravecto® na dosagem de 25-56mg de fluralaner/ kg de peso
194 corporal no dia 0 do estudo, por via oral; e um grupo controle (GC), que não
195 recebeu nenhum medicamento no decorrer do estudo. O comprimido foi
196 oferecido voluntariamente aos animais do grupo tratamento, mas quando
197 necessário foi administrado juntamente à ração úmida ou diretamente na boca
198 do cão. Após a administração, todos os cães receberam alimento comercial
199 úmido. Os cães do grupo controle receberam também alimento úmido no
200 momento da seleção, de modo que nem os tutores nem a equipe de
201 examinadores tiveram indicação de que aqueles cães não haviam recebido a
202 medicação.

203 A fim de garantir a homogeneidade entre os grupos, os animais foram
204 balanceados por randomização, através da qual os cães foram alocados
205 aleatoriamente em cada um dos grupos experimentais através de uma lista
206 gerada anterior ao dia 0 de estudo, na proporção de 1:1. As atividades da

207 pesquisa foram distribuídas entre duas equipes, uma composta pelos envolvidos
208 nas atribuições e administração do tratamento (tratador), que não participou de
209 nenhuma avaliação clínica, e a outra composta por seis examinadores,
210 responsáveis pelas avaliações clínicas e parasitológicas.

211 Durante o estudo foi permitido tratar os animais, caso necessário, para
212 infecções bacterianas secundárias à tungíase, além de qualquer procedimento
213 de saúde de rotina. No entanto, foi proibido o uso de medicamentos parasiticidas
214 ou outros produtos com atividade inseticida durante o período de estudo. Nesse
215 sentido, vale destacar que animais previamente tratados com ectoparasiticidas
216 a base de isoxazolina, amitraz, fipronil, lactonas macrocíclicas ou piretroides em
217 menos de 30 dias anteriores ao início do estudo não foram admitidos, tão pouco
218 aqueles tratados com fluralaner em menos de 90 dias prévios ao D0 ou
219 submetidos a produtos para controle de pulgas de ação curta nas últimas duas
220 semanas que antecederam a pesquisa.

221 Um total de nove visitas programadas foram realizadas para cada cão
222 incluído no estudo nos dias 0 (inclusão e tratamento), + 7 (± 2), + 14 (± 2), +21
223 (± 2), +28 (± 2), + 60 (± 7), +90 (± 7), +120 (± 7), +150 (± 7). No primeiro mês
224 após o tratamento, os cães do estudo foram avaliados semanalmente.
225 Posteriormente, para avaliar a eficácia residual os animais foram avaliados
226 mensalmente por quatro meses após o tratamento.

227227

228 Avaliação clínica e parasitológica e documentação das lesões

229 Em cada visita todos os cães eram submetidos à avaliação clínica geral
230 de todos os sistemas e tinham seus corpos examinados sistematicamente na
231 cabeça, tronco, cauda, abdômen ventral e membros, por meio de separação dos

232 pelos, palpação e observação de lesões associadas à tungíase. Foi dada ênfase
233 aos locais de predileção de pulgas *T. penetrans*, isto é, patas, membros, cauda,
234 glândulas mamárias, testículo e nariz. As patas dos cães foram higienizadas para
235 permitir a detecção eficiente das pulgas incrustadas. O estadiamento das lesões
236 foi realizada de acordo com a Classificação Fortaleza [19].

237 A pontuação de gravidade para tungíase aguda em cão foi utilizada para
238 avaliar o estado clínico dos cães em relação ao tratamento durante o estudo.
239 Assim, através da contagem das lesões agudas, foi atribuída uma pontuação,
240 que posteriormente foi somada, resultando no escore de gravidade dos sinais
241 clínicos (SCADT - Tabela 1). Caso o animal ultrapasse a pontuação máxima do
242 SCADT, o cão deveria ser tratado para tungíase e não poderia participar do
243 estudo. Todas as lesões foram classificadas, quantificadas e documentadas
244 através de fotografias e fichas de exame parasitológico de pele.

245 Tabela 1. Pontuação por score de gravidade para sinais clínicos agudos de
246 tungíase

Sinais clínicos característicos	Número de sites topográficos afetados	Pontuação atribuída
Hiperemia e / ou edema ^a	1 - 5	1
	6 - 10	2
	11-16	3
Dor na pressão digital	1 - 5	1
	6 - 10	2
	11-16	3
Supuração e / ou formação de abscesso ^a	1 - 5	1
	6 - 10	2
	11-16	3
Agrupamento de lesões ^b	1 - 5	1
	6 - 10	2
	11-16	3
Fissura (s) ^a	1 - 5	1
	6 - 10	2
	11-16	3
Ulcerações de pele ^a	1 - 5	1
	6 - 10	2
	11-16	3
Mutilação de lesões, independentemente dos locais envolvidos ^c		2
Andar alterado / claudicação		3
Ectopia de lesões		0,5 ^d

247 ^a Independentemente do número de focos e do tamanho da área envolvida em
248 um sítio topográfico designado .

249 ^b Três ou mais lesões em estreita proximidade (1 - 2 mm entre si) .

250 ^c A mutilação das lesões reflete coceira intensa.

251 ^d Para cada parte ectópica discreta do corpo envolvida até um máximo de oito
252 locais ectópicos; máximo 4 pontos .

253 Assim, a pontuação máxima (S C A D T) para um indivíduo cão doente pode ser
254 até 27 (23 + 4).

255

256 Considerações estatísticas

257 A análise estatística para avaliar a eficácia foi realizada usando o pacote

258 de software SAS® (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA, versão 9.4), com o cão

259 como unidade experimental. A avaliação da eficácia primária foi avaliada apenas
 260 para a população protocolo (PP), baseada na porcentagem de cães livres de
 261 parasitas (cães livres de pulgas vivas, estágios II e III). Em cada ponto no tempo
 262 de avaliação pós-tratamento, o teste de Fisher foi usado com um nível de
 263 significância de $\alpha = 0,025$ para comparar a porcentagem de casos livres de
 264 parasitas entre o GC e o GT.

265 A eficácia secundária foi avaliada somente na população PP com base no
 266 número de pulgas vivas (estágios II e III) e em relação à pontuação de
 267 severidade dos sinais clínicos para tungíase aguda (SCADT). Em cada ponto de
 268 tempo de avaliação pós-tratamento, a eficácia do tratamento foi calculada da
 269 seguinte forma:

270270

$$2712 \quad Eficácia [\%] = \frac{\bar{x}_c - \bar{x}_t}{\bar{x}_c} \cdot 100$$

7
1

2722
7

2 Onde, \bar{x}_c : Média geométrica da contagem de pulgas vivas no grupo

2732 CP

7

3 \bar{x}_t : Média geométrica da contagem de pulgas vivas no grupo IVP

2742 Para permitir o cálculo em caso de contagem zero, a média

7

4

2:75

276

277 geométrica foi calculada da seguinte forma:

$$278 \quad x_g = \left(\prod_{i=1}^n (x_i + 1) \right)^{\frac{1}{n}} - 1$$

279279

280 Para confirmar os resultados de eficácia secundária para cada ponto de

281 tempo, as contagens de pulgas vivas transformadas em $(x' = \log(x + 1))$ no grupo

282 GT e GC foram comparadas usando um teste t bilateral para duas amostras com
283 o nível de significância estabelecido em $\alpha = 0,05$.

284 Os escores de gravidade total para tungíase canina aguda (SCADT) nos
285 dois grupos foram comparados em cada ponto de tempo de avaliação pós-
286 tratamento usando o teste de soma de postos de Wilcoxon (exato), com o
287 nível de significância definido como $\alpha = 0,05$ (bilateral).

288 De acordo com as diretrizes para avaliação da eficácia de substâncias
289 antiparasitárias para o tratamento e prevenção de carrapatos e pulgas em cães
290 e gatos a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), foi definido que a eficácia
291 do produto proposto deve ser de pelo menos 95% para pulgas adultas e pelo
292 menos 90% para pulgas emergentes a adultas, e apresentar nas contagens entre
293 os animais tratados e não tratados diferença estatística com nível de 5%.

294

295

RESULTADOS

296 No dia 0, a contagem de pulgas *T. penetrans* apresentou uma
297 superioridade significativa ($p < 0,025$) no grupo tratado (GT) em relação ao grupo
298 controle negativo (GC), com médias variando entre $27,3 \pm 36,8$ e $14,6 \pm 16,6$,
299 respectivamente, com a contagem de pulgas do GT variando de 1 a 180 pulgas
300 por animal; no GC a faixa de variação foi de 1 a 63 pulgas.

301

Eficácia primária

302 Na avaliação parasitológica de pele no dia 7, 17 (54,84%) dos 31 cães do
303 GT estavam livres das pulgas. No dia 14, apenas um (3,32%) cão do GT
304 apresentou lesão viva. Nas avaliações dos dias 21, 28 e 60 os animais do GT não
305 apresentaram nenhuma lesão vital, ou seja o tratamento resultou em 100% de
306 proteção, uma vez que impediu a reinfestação nesse período. No dia 90, 29
307 (93,55%) cães do GT estavam livres de parasitas viáveis e sem sinais de lesões
308 ativas e no dia 120, 24 (77,42%) cães sem lesões viáveis. No dia 150, última

309 avaliação, foram observados 11 (36,67%) cães sem lesões ativas referentes à
 310 tungiase. Alguns cães do GC apresentaram-se livres de lesões ativas durante o
 311 estudo, porém houve reinfestação ao longo da avaliação. O maior percentual de
 312 cães não tratados e livres de lesões ativas ocorreu no 90° após o tratamento
 313 (Tabela 2)

314314

315315

Dia	Fluralaner		Sem tratamento		Valor p
	N	%	N	%	
7	17 de 31	54,84	5 de 31	16,13	0,0015
14	30 de 31	96,77	6 de 31	19,35	<0,0001
21	31 de 31	100,00	6 de 31	19,35	<0,0001
28	31 de 31	100,00	6 de 31	19,35	<0,0001
60	31 de 31	100,00	11 de 30	36,67	<0,0001
90	29 de 31	93,55	13 de 29	44,83	<0,0001
120	24 de 31	77,42	10 de 28	35,71	0,0013
150	11 de 30	36,67	4 de 28	14,29	0,0488

316 Tabela 2. Número e porcentagem de cães livres de pulgas por dia de estudo por
 317 grupo.

318318

319 Durante as primeiras avaliações já era possível observar a diferença entre
 320 na contagem de pulgas dos dois grupos durante os exames parasitológicos de
 321 pele (Fig 1). No dia 7 de avaliação, a maioria dos cães do GT não apresentavam
 322 mais lesões vitais causadas por tungiase, já no dia 21, 100% dos cães do GT
 323 estavam livres de tungiase. No entanto, era notável que os cães do GC
 324 apresentaram uma persistência de lesões ativas características de tungiase por
 325 todo o período de avaliações.



326326

327 Fig1. A) Dia 0, cão do GT com múltiplas lesões causadas por *T. penetrans* em
 328 estágio II e III localizadas em coxins; B) Dia 7, após o tratamento não apresentava
 329 mais lesões vitais, apenas cicatrizes das involuções dos parasitas; C) Dia 21, os
 330 coxins estavam repitelizados e se mantiveram livres das lesões vitais; D) Dia 0,
 331 cão do GC com múltiplas lesões vitais características de tungíase nos coxins dos
 332 membros anteriores; E) Dia 7, cão com inúmeras lesões vitais nos estágios II e
 333 III, F) Dia 21, é possível observar a continuidade das lesões vitais II e III causadas
 334 pela pulga *T. penetrans*.

335335

336 Eficácia Secundária

337 A comparação estatística dos casos livres de parasitas no GT e no GC
 338 mostrou que o tratamento era eficaz em cada tempo de avaliação até dia 120
 339 através das médias geométricas (Tabela 3). A diferença entre os grupos de
 340 estudo não foi significativa apenas no dia 150.

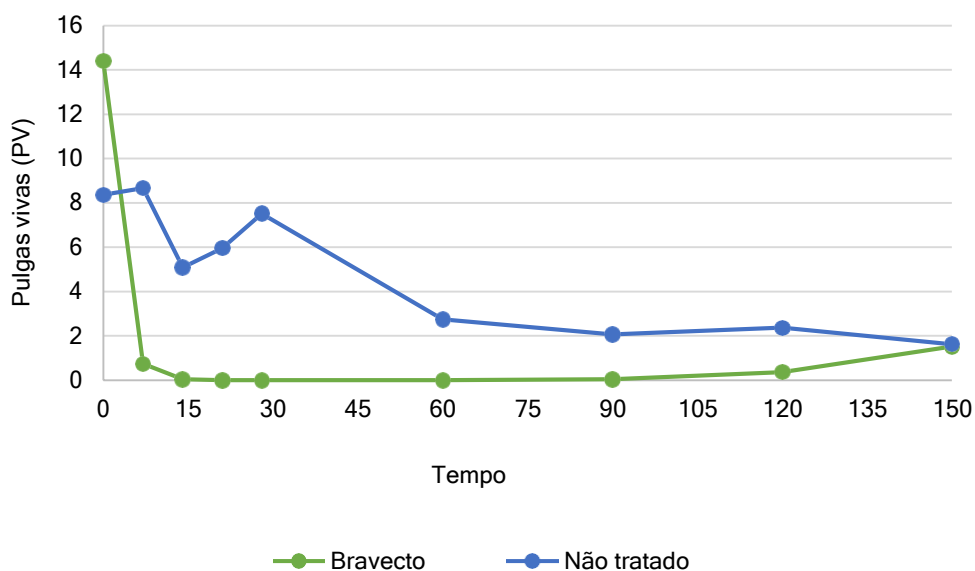
Dia	Média de contagens de pulgas vivas		Eficácia [%]	Valor p
	Fluralaner	Sem tratamento		
7	0,74	8,67	91,48	<0,0001
14	0,05	5,09	99,10	<0,0001
21	0,00	5,95	100,00	<0,0001
28	0,00	7,51	100,00	<0,0001
60	0,00	2,74	100,00	<0,0001
90	0,05	2,07	97,79	<0,0001
120	0,37	2,37	84,38	0,0036
150	1,52	1,62	6,34	0,8687

341 Tabela 3. Contagens médias de pulgas vivas, eficácia e valores p com base em
342 médias geométricas.

343 Do dia 7 da avaliação a eficácia de fluralaner foi de 91,48%. No entanto,
344 do dia 14 ao dia 90 de avaliação a eficácia secundária foi superior de 95%
345 apresentando diferença significativa nesses pontos de tempo após o tratamento
346 ($p < 0,05$). Na avaliação do dia 120 a eficácia também apresentou diferença
347 significativa entre os grupos, no entanto observa-se um declínio da eficácia, que
348 apresentou-se acima de 84%. Entretanto, no dia 150 não houve diferença
349 significativa entre os grupos de estudo e a eficácia secundária não alcançou
350 10%.

351 Durante o período de avaliação o curso das contagens das médias
352 geométricas de pulgas vivas em cada grupo de estudo variou do dia 0 ao 120 de
353 forma significativa ($p < 0,001$) entre os grupos (Fig 2).

354354



358 Figura 2. Média geométrica da contagem de *Tunga penetrans* por grupo de
359 estudo.

360 A eficácia secundária que também foi observada através da gravidade da
361 tungíase canina aguda (SCADT) por dia de avaliação e grupo de estudo, bem os
362 resultados da análise estatística (Tabela 4). Os escores médios
363 de gravidade total diferiram significativamente entre os grupos de estudo do Dia
364 7 ao Dia 120. Após o tratamento, as pontuações SCADT foram menores no
365 grupo tratado em comparação com o grupo controle não tratado, exceto para a
366 última observação no Dia 150, no qual o intervalo de SCADT foi maior no GT em
367 relação ao GC (Fig 3).

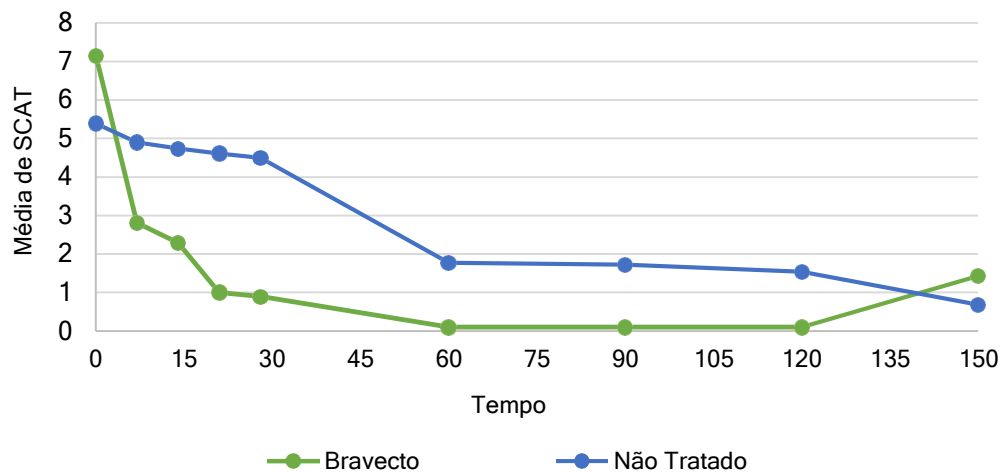
368368

Dia	Fluralaner		Sem tratado		Valor p
	Média ± DP	Intervalo	Média ± DP	Intervalo	
7	2.81 ± 2.37	0 – 9	4.90 ± 3.17	0 – 12	0.0074
14	2.29 ± 1.74	0 – 6	4.74 ± 3.20	0 – 11	0.0017
21	1.00 ± 1.39	0 – 4	4.61 ± 4.11	0 – 17	<0.0001
28	0.90 ± 1.60	0 – 6	4.50 ± 3.60	0 – 13	<0.0001
60	0.10 ± 0.40	0 – 2	1.77 ± 2.69	0 – 9	0.0003
90	0.10 ± 0.54	0 – 3	1.72 ± 2.46	0 – 9	<0.0001
120	0.10 ± 0.30	0 – 1	1.54 ± 2.63	0 – 10	0.0011
150	1.43 ± 2.56	0 – 9	0.68 ± 1.29	0 – 5	0.4701

369 Tabela 4. Escores de gravidade total de tungiase canina (SCADT) por dia de
370 estudo e grupo de estudo.

371 Com esses resultados foi possível observar que alguns cães sem lesões
372 vitais não tiveram o escore de sinais clínicos agudos zerado, da mesma forma
373 que cães com lesões vitais apresentaram em algum período de avaliação escore
374 igual a zero. Ressalta-se que os sinais clínicos agudos abordados no SCADT
375 não são apenas observados com exclusividade na tungiase, e que outras
376 alterações dermatológicas como por exemplo dermatites alérgicas poderiam
377 estar relacionadas a essa manutenção. De acordo com a quantidade de lesões
378 vitais nos cães a quantidade de sinais também podem variar.

379379



3803
8
0

381 Fig 3. Pontuação média de score de gravidade dos sinais clínicos agudos
382 (SCADT) por grupo de estudo do Dia 7 ao 150.

383 Dessa forma, a condição clínica no que diz respeito à tungíase nos cães
384 do GT foi melhor durante o período avaliado, como já observado na tabela 4,
385 exceto no dia 150. Houve melhora na condição clínica nos animais tratados em
386 relação aos animais não tratados. O impacto do tratamento pôde ser observado
387 através da diminuição dos sinais clínicos avaliados no SCADT, que.
388 Conseqüentemente, proporcionou qualidade de vida aos animais tratados,
389 através do controle das lesões causadas pelas pulgas *T. penetrans* (Fig 4).

390390

391391



392392

393 Fig 4 – A) No dia 0, o cão do grupo tratamento apresentava múltiplas lesões
 394 causadas por *T. penetrans* em estágio II e III localizadas em coxins; B) No dia
 395 28 após o tratamento os coxins já não apresentam nenhuma lesão vital; C) Dia
 396 60, os coxins estão repitelizados e se mantiveram livres das lesões vitais,
 397 comprovando a eficácia no tempo descrita nos resultados; D) Coxins no dia 90
 398 livres de lesões de tungíase.

399 Durante o estudo quatro cães foram removidos, três deles por óbito. O
 400 primeiro óbito foi relacionado a briga com outro cão, o segundo por razão
 401 desconhecida (ambos pertenciam ao GC) e o último por atropelamento (GT).
 402 Um cão do GC foi afastado do projeto a pedido do tutor. No entanto, os dados
 403 recolhidos antes da remoção dos cães são considerados válidos, sendo assim
 404 utilizados na análise estatística. As mortes dos três cães não foram relacionadas
 405 ao tratamento com fluralaner. Não foram relatados efeitos adversos associados
 406 ao uso do fluralaner nesse estudo.

407407

408

DISCUSSÃO

409 O fluralaner é um potente acaricida e inseticida da família das
410 isoxazolininas, uma classe de antiparasitários de ação sistêmica, que apresenta
411 eficácia de longa duração e proteção contra ectoparasitas [20,21]. Como
412 observado nas condições do presente estudo uma única administração do
413 comprimido de Bravecto® a cães naturalmente infestados por *T. penetrans*
414 proporcionou eficácia acima de 95% durante 12 semanas, tempo descrito na
415 literatura para combate a outras espécies de pulgas [22]. Essa disponibilidade
416 sistêmica com longo período de duração pode ser justificada pelo baixo
417 clearance e elevada distribuição do fluralaner para os tecidos avaliados em
418 outros estudos [24].

419 A ação adulticida do princípio ativo em pulgas pôde ser identificada a partir
420 no sétimo dia por conta da eficácia acima de 90% e dá diferença estatística entre
421 os grupos, no controle número desses insetos nos cães no GT já no sétimo dia
422 após o tratamento. Embora esse estudo seja pioneiro na avaliação da eficácia
423 do fluralaner para o combate à *T. penetrans*, estudos prévios comprovaram a
424 eficácia do fluralaner não somente na redução de pulgas adultas
425 (*Ctenocephalides felis*) em cães, mas também na prevenção da sua reprodução
426 [20] e redução da produção dos ovos em 99,9% após 48 horas de tratamento,
427 inviabilizando, inclusive, o desenvolvimento para a fase adulta [25].
428 Adicionalmente, a manutenção da alta eficácia adulticida observada do dia 7 ao
429 120, característica do fármaco, contribuiu, juntamente com sua eficácia na para
430 morte das pulgas *T. penetrans* fêmeas. Essa hipótese é baseada no fato de que
431 através da morte provocada pelo medicamento das pulgas fêmeas adultas, há
432 uma interrupção na disseminação de ovos que já poderiam estar desenvolvidos,

433 o que interrompe o ciclo de vida do parasita, consequentemente controlando sua
434 presença no ambiente, desfavorecendo as reinfestações [25,26].

435 Alguns autores também descreveram o início de ação para o combate a
436 *C. felis* em cães na primeira hora após o tratamento. Esses dados são
437 justificados pela toxicocinética do princípio ativo. Após a absorção do fármaco, a
438 concentração plasmática máxima é alcançada em 24 horas [21, 28]. Entretanto,
439 no presente estudo avaliando a eficácia primária do fluralaner no combate a *T.*
440 *penetrans*, observou-se que, apesar de ter eliminado elevada porcentagem de
441 pulgas na primeira semana após a administração do fluralaner, sete dias após o
442 início do tratamento havia apenas 54,84%os cães livres do parasita. Esse
443 resultado pode ser justificado pelo tempo de meia-vida plasmática de absorção
444 do fluralaner, que varia de 12 a 15 dias [25,28].

445 A partir dos resultados do estudo foi possível observar 100% de eficácia
446 primária para *T. penetrans* do dia 21 ao dia 60 após o tratamento, o que coincide
447 com a eficácia em um ensaio para a espécie de pulga *C. felis* também em cães
448 [29]. Embora no dia 90 a eficácia tenha reduzido para 99,1%, ainda assim essa
449 permaneceu elevada durante as 12 semanas após o tratamento. Uma eficácia
450 acima de 95% é considerada característica indispensável para que um
451 ectoparasiticida seja considerado eficaz, já que se uma única pulga adulta
452 sobreviver ela pode reiniciar a infestação [30]. O estabelecimento de novas
453 infestações em dois dos cães do GT no dia 90 pode ter relação com alguma
454 característica particular do animal re-infestado, animais com baixos níveis de
455 tecido adiposo podem apresentam menor eficácia do fármaco, uma vez que a
456 substância tem predileção pelo armazenamento nesse tecido [31].

457 É válido destacar que o estudo foi conduzido em uma área de elevada
458 infestação humana e animal, cuja região apresenta características favoráveis ao
459 desenvolvimento e manutenção da *T. penetrans* durante todo o ano [13,15]
460 demonstrado a eficácia do fluralaner sob elevado desafio de campo.

461 Após 12 semanas com eficácia variando de 91,48 a 100%, no dia 120
462 após tratamento observou-se um declínio significativo da eficácia, que foi de
463 84,34%, o que pode ter ocorrido por uma diminuição na biodisponibilidade do
464 fármaco, aumento do desafio de campo ou interação medicamentosa [31].

465 Sobre a pontuação do escore de gravidade, que está relacionada aos
466 sinais clínicos agudos de tungíase descritos anteriormente em outros estudos
467 [5,13], observamos que o GT apresentou escore menor e estatisticamente
468 significativo em relação ao GC do dia 7 ao 120. A diminuição dos sinais
469 relacionados às lesões por *T. penetrans* proporcionou aos cães uma melhor
470 qualidade de vida. Os animais voltaram a caminhar normalmente e tiveram seu
471 bem-estar reestabelecido, uma vez que os sinais como dor, prurido e edema
472 causam agitação e inquietação nos cães infestados, além desses animais, na
473 maioria das vezes, realizarem mutilação dos coxins afetados, exacerbando os
474 sinais clínicos locais, conduzindo a complicações que podem culminar na perda
475 de dígitos e membros [5].

476 O tratamento com o comprimido palatável de fluralaner além de eficaz,
477 mostrou-se seguro, visto que nenhum animal tratado apresentou efeito colateral
478 depois da administração do fármaco, assim como já descrito em outros estudos,
479 que afirmam que o fármaco é seguro para o uso em cães [29]. Certamente a
480 seletividade significativa pelos neurônios de insetos em relação aos neurônios
481 de mamíferos contribui para essa segurança [20,21,28]. Além de outras

482 vantagens relevantes para o uso do fluralaner em cães, como os fatos do
483 fármaco não ter seu efeito diminuído pela ação da chuva ou banho [33], além de
484 ter indicação para administração trimestral facilitando a manutenção do
485 tratamento, pois diminui falhas na administração pelos tutores em relação ao
486 medicamento mensal, que pode ser facilmente esquecido [34].

487487

488

CONCLUSÃO

489 Uma única administração oral de comprimidos mastigáveis Bravecto para cães
490 é eficaz para eliminar e prevenir pulgas da espécie *T. penetrans* durante 12
491 semanas. A condição clínica dos cães tratados foi melhor do que o grupo de
492 controle durante o mesmo período. O fluralaner foi bem tolerado pelos cães do
493 estudo, uma vez que não houve efeitos adversos.

494494

495

AGRADECIMENTOS

496 A empresa MSD Animal Health Innovation GmbH, fabricante do fármaco
497 Bravecto® pelo financiamento do projeto de pesquisa. Aos proprietários dos
498 animais que comprometeram-se com o projeto acompanhando seus cães
499 durante as avaliações o nosso agradecimento.

500500

501

CONFLITO DE INTERESSE

502 Os autores informam que não há conflitos de interesse. Os autores são
503 inteiramente responsáveis pelo conteúdo e redação do artigo.

504504

505

FINANCIAMENTO

506 Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
507 (FAPESB) e à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pela concessão de
508 bolsas de estudos. O projeto foi financiado pela empresa MSD Animal Health
509 Innovation GmbH, fabricante do fármaco Bravecto®. This study was financed in
510 part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –
511 Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

512

513

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

514 [1] J. Heukelbach, “Revision on tungiasis: Treatment options and prevention,”
515 *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 4, no. 1, pp. 151-157, 2006.

516

517 [2] M. Lefebvre, C. Capito, C. Durant, B. Hervier, and O. Grossi, “Tungiasis: A
518 poorly documented tropical dermatosis,” *Medecine at Maladies Infectieuses*, vol.
519 41, no. 9, pp. 465-468, 2011.

520

521 [3] M. Thielecke, V. Raharimanga, C. Rogier, M. Stauss-Grabo, V. Richard, and
522 H. Feldmeier, “Prevention of Tungiasis and Tungiasis-Associated Morbidity Using
523 the Plant-Based Repellent Zanzarin: A Randomized, Controlled Field Study in
524 Rural Madagascar,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 9, 2013.

525

526 [4] J. Heukelbach, F. A. Sales De Oliveira, G. Hesse, and H. Feldmeier,
527 “Tungiasis: A neglected health problem of poor communities,” *Tropical Medicine*
528 *and International Health*, vol. 6, no. 4, pp. 267-272, 2001.

529

530 [5] T. V. Harvey, J. Heukelbach, M. S. Assunção, T. M. Fernandes, C. M. B. M.
531 da Rocha, and R. S. A. Carlos, “Canine tungiasis: High prevalence in a 516 tourist
532 region in Bahia state, Brazil,” *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 139, pp. 76-
533 81, 2017.

534

535 [6] H. Feldmeier, J. Heukelbach, M. Eisele, A. Queiroz Sousa, L. Marilac Meireles
536 Barbosa, and C. B. M. Carvalho, "Severe tungiasis in underprivileged
537 communities: Case series from Brazil," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 9, no.
538 8, pp. 949-955, 2003.

539

540 [7] J. Heukelbach, "Invited review - Tungiasis," *Revista do Instituto de Medicina*
541 *Tropical de Sao Paulo*, vol. 47, no. 6, pp. 307-313, 2005.

542

543 [8] H. Feldmeier, J. Heukelbach, M. Eisele, A. Queiroz Sousa, L. Marilac Meireles
544 Barbosa, and C. B. M. Carvalho, "Bacterial superinfection in human tungiasis,"
545 *Tropical Medicine and International Health*, vol. 7, no. 7, pp. 559-564, 2002.

546

547 [9] J. K. Joseph et al., "Tungiasis in rural Haiti: a community-based
548 response," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*,
549 vol. 100, no. 10, pp. 970-974, 2006.

550

551 [10] T. Wilcke, J. Heukelbach, R. César Sabóia Moura, L. Regina Sansigolo Kerr-
552 Pontes, and H. Feldmeier, "High prevalence of tungiasis in a poor neighbourhood
553 in Fortaleza, Northeast Brazil," *Acta Tropica*, vol. 83, no. 3, pp. 255-258, 2002.

554

555 [11] R. M. Nyangacha et al., "Secondary bacterial infections and antibiotic
556 resistance among tungiasis patients in Western, Kenya," *PLoS Neglected*
557 *Tropical Diseases*, vol. 11, no. 9, pp. 1-11, 2017.

558

559 [12] J. Heukelbach, A. M. L. Costa, T. Wilcke, N. Mencke, and H. Feldmeier, "The
560 animal reservoir of *Tunga penetrans* in severely affected communities of north-
561 east Brazil," *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 18, no. 4, pp. 329-335,
562 2004.

563

564 [13] W. de M. Bonfim, M. D. Cardoso, V. de A. Cardoso, and R. Andreazze,
565 “Tungíase em uma área de aglomerado subnormal de Natal-RN: 551 prevalência
566 e fatores associados,” *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, vol. 19, no. 4, pp.
567 379-388, 2010.

568

569 [14] T. V. Harvey, J. Heukelbach, M. S. Assunção, T. M. Fernandes, C. M. B. M.
570 da Rocha, and R. S. A. Carlos, “Seasonal variation and persistence of tungiasis
571 infestation in dogs in an endemic community, Bahia State (Brazil): longitudinal
572 study,” *Parasitology Research*, vol. 118, no. 6, pp. 1711-1718, 2019.

573

574 [15] J. Heukelbach, T. Wilcke, G. Harms, and H. Feldmeier, “Seasonal variation
575 of tungiasis in an endemic community,” *American Journal of Tropical Medicine
576 and Hygiene*, vol. 72, no. 2, pp. 145-149, 2005.

577

578 [16] R. K. R. and M. C. N. Susanne Kilp, Diana Ramirez, Mark J Allan,
579 “Pharmacokinetics of fluralaner in dogs following a single oral or 566 intravenous
580 administration Susanne,” *Parasites and Vectors*, vol. 11, no. 1, pp. 1-5, 2018.

581

582 [17] J. N. P. SOUB, “Minha Ilhéus, Fotografias do século XX e um pouco da
583 Nossa História.” 2013.

584

585 [18] Centro de Pesquisas do Cacau. *Climatologia*,
586 “BRAZIL/MAPA/CEPLAC/CEPEC/SERAM Centro,” 2016.

587

588 [19] M. Eisele et al., “Investigations on the biology, epidemiology, pathology and
589 control of *Tunga penetrans* in Brazil: I. Natural history of tungiasis in man,”
590 *Parasitology Research*, vol. 90, no. 2, pp. 87-99, 2003.

591

592 [20] H. Williams, D. R. Young, T. Qureshi, H. Zoller, and A. R. Heckerroth,
593 “Fluralaner, a novel isoxazoline, prevents flea (*Ctenocephalides felis*)
594 reproduction in vitro and in a simulated home environment,” *Parasites and*
595 *Vectors*, vol. 7, no. 1, pp. 4-9, 2014.

596

597 [21] M. Gassel, C. Wolf, S. Noack, H. Williams, and T. Ilg, “The novel isoxazoline
598 ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid-
599 and l-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity,”
600 *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 45, no. 1, pp. 111-124, 2014.

601

602 [22] M. W. Dryden et al., “Evaluation of fluralaner and afoxolaner treatments to
603 control flea populations, reduce pruritus and minimize dermatologic lesions in
604 naturally infested dogs in private residences in west central Florida USA,”
605 *Parasites and Vectors*, vol. 9, no. 1, pp. 1-11, 2016.

606

607 [23] J. Taenzler, J. Liebenberg, R. K. A. Roepke, R. Frénais, and A. R. Heckerroth,
608 “Efficacy of fluralaner administered either orally or topically for the treatment of
609 naturally acquired *Sarcoptes scabiei* var. *canis* infestation in dogs,” *Parasites*
610 *and Vectors*, vol. 9, no. 1, pp. 1-5, 2016.

611

612 [24] S. Kilp, D. Ramirez, M. J. Allan, R. Ka, and M. C. Nuernberger,
613 “Pharmacokinetics of fluralaner in dogs after a single oral or intravenous
614 administration,” *Parasites and Vectors*, v. 7, no. 1 pp. 1-5, 2014.

615

616 [25] F. Beugnet, J. Liebenberg, and L. Halos, “Comparative speed of efficacy
617 against *Ctenocephalides felis* of two oral treatments for dogs containing either
618 afoxolaner or fluralaner,” *Veterinary Parasitology*, vol. 207, no. 3-4, 607 pp. 297-
619 301, 2015.

620

621 [26] S. Ranjan, D. Young, and F. Sun, "A single topical fluralaner application to
622 cats and to dogs controls fleas for 12 weeks in a simulated home environment,"
623 *Parasites and Vectors*, vol. 11, no. 1, pp. 1-6, 2018.

624

625 [27] H. Dongus, L. Meyer, and R. Armstrong, "Water immersion of dogs close to
626 the time of topical fluralaner treatment does not reduce efficacy against
627 subsequent experimental challenge with *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato),"
628 *Parasites and Vectors*, vol. 10, no. 1, pp. 9-11, 2017.

629

630 [28] J. Taenzler et al., "Onset of activity of fluralaner (BRAVECTOTM) against
631 *Ctenocephalides felis* on dogs," *Parasites and Vectors*, vol. 7, no. 1, pp. 1-4,
632 2014.

633

634 [29] N. Rohdich, R. K. Roepke, and E. Zschiesche, "A randomized, blinded,
635 controlled and multi-centered field study comparing the efficacy and safety of
636 BravectoTM (fluralaner) against FrontlineTM (fipronil) in flea- and tick infested
637 dogs," *Parasites and Vectors*, vol. 7, no. 1, pp. 2-6, 2014.

638

639 [30] M. W. Dryden et al., "Efficacy of fluralaner flavored chews (Bravecto®)
640 administered to dogs against the adult cat flea, *Ctenocephalides felis felis* and
641 egg production," *Parasites and Vectors*, vol. 8, no. 1, 2015.

642

643 [31] F. M. Walther, A. J. Paul, M. J. Allan, R. K. Roepke, and M. C. Nuernberger,
644 "Safety of fluralaner chewable tablets (BravectoTM), a novel system antiparasitic
645 drug, in dogs after oral administration," *Parasites and Vectors*, vol. 7, no. 1, pp.
646 1-7, 2014.

647

648 [32] Y. Ozoe, M. Asahi, F. Ozoe, K. Nakahira, and T. Mita, "The antiparasitic
649 isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels,"
650 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 391, n. 1, pp. 744-
651 749, 2010.

652

653 [33] T. B. Coles and M. W. Dryden, "Insecticide/acaricide resistance in fleas and
654 ticks infesting dogs and cats," *Parasites and Vectors*, vol. 7, no. 1, pp. 1-10,
655 2014.

656

657 [34] H. Dongus, L. Meyer, R. Armstrong, "Water immersion of dogs close to the
658 time of topical fluralaner treatment does not reduce efficacy against a subsequent
659 experimental challenge with *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato)", *Parasites
660 and Vectors*, vol.10, no.1, pp. 9-11 ,2017.

ANEXO I

REGRAS DA REVISTA PLOS Neglected Tropical Diseases PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Submission Guidelines

PLOS Neglected Tropical Diseases publishes original research articles of importance to the NTDs community and the wider health community. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a more limited range of experiments.

The writing style should be concise and accessible, avoiding jargon so that the paper is understandable for readers outside a specialty or those whose first language is not English. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions.

PLOS Neglected Tropical Diseases is committed to the highest ethical standards in medical research. Accordingly, we ask authors to provide specific information regarding ethical treatment of research participants, patient consent, patient privacy, protocols, authorship, and competing interests. We also ask that reports of certain specific types of studies adhere to generally accepted standards. Our requirements are based on the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, issued by the International Committee for Medical Journal Editors.

Style and Format

If your submission receives a provisional Editorial Accept decision, we'll ask you to adjust your manuscript to meet our formatting guidelines prior to Formal Acceptance. Until then, we do not require journal-specific formatting.

Copyediting manuscripts

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from in-depth professional copyediting are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service".

Note that if your manuscript is accepted, PLOS will not perform a detailed copyediting step. Therefore, please carefully review your manuscript, paying

File format	<p>Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected.</p> <p>LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.</p>
Length	<p>Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information.</p> <p>We encourage you to present and discuss your findings concisely.</p>
Font	<p>Use a standard font size and any standard font, except for the font named "Symbol". To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.</p>
Headings	<p>Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.</p>
Layout and spacing	<p>and Manuscript text should be double-spaced.</p> <p>Do not format text in multiple columns.</p>
Page and line numbers	<p>Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).</p>
Tables	<p>Insert tables immediately after the first paragraph in which they are cited.</p>
Supporting Information	<p>Upload Supporting Information (SI) files separately.</p>
Footnotes	<p>Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.</p>
Language	<p>Manuscripts must be submitted in English.</p> <p>You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.</p>
Abbreviations	<p>Define abbreviations upon first appearance in the text.</p> <p>Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text.</p>

special attention to spelling, punctuation, and grammar, as well as scientific content.

	Keep abbreviations to a minimum.
Reference style	PLOS uses “Vancouver” style, as outlined in the ICMJE sample references . See reference formatting examples and additional instructions below.
Equations	<p>We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor or Microsoft’s Insert→Equation function is acceptable.</p> <p>Avoid using MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function to insert single variables (e.g., “$a^2 + b^2 = c^2$”), Greek or other symbols (e.g., β, Δ, or ' [prime]), or mathematical operators (e.g., x, \geq, or \pm) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values.</p> <p>Do not use MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Equations should not contain a mix of different equation tools. Avoid “hybrid” inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.</p>

Manuscript Organization

Most manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below.

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract
- Author Summary
- Introduction
- Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgments
- References
- Supporting information Captions

Nomenclature Use correct and established nomenclature wherever possible.

<i>Units of measurement</i>	Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.
<i>Drugs</i>	Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).
<i>Species names</i>	Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., <i>H. sapiens</i>).
<i>Genes, mutations, genotypes, and alleles</i>	Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).
<i>Allergens</i>	The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee prior to manuscript publication. Examples of the systematic allergen nomenclature can be found at the WHO/IUIS Allergen Nomenclature site .

Uniformity in format facilitates the experience of readers and users of the journal. To provide flexibility, however, the Results and Discussion can be combined into one Results/Discussion section.

Viewing Figures and Supporting Information in the compiled submission PDF

The compiled submission PDF includes low-resolution preview images of the figures after the reference list. The function of these previews is to allow you to download the entire submission as quickly as possible. Click the link at the top of each preview page to download a high-resolution version of each figure. Links to download Supporting Information files are also available after the reference list.

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, concise, comprehensible outside the field	Impact of cigarette smoke exposure on and innate immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> model Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhoea in rural Bolivia: A cluster-randomized, controlled trial
Short title	70 characters	State the topic of the study	Cigarette smoke exposure and innate immunity SODIS and childhood diarrhoea

Titles should be written in sentence case (only the first word of the text, proper nouns, and genus names are capitalized). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the [authorship policy](#). Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments. [Read more about Acknowledgments](#).

The corresponding author must provide an ORCID iD at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system. [Read more about ORCID](#).

Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- First name (or initials, if used)
- Middle name (or initials, if used)
- Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. Authors have the option to include a current address in addition to the address of their affiliation at the time of the study. The current address should be listed in the byline and clearly labeled “current address.” At a minimum, the address must include the author’s current institution, city, and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation. Author affiliations will be listed in the typeset PDF article in the same order that authors are listed in the submission.

Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

Corresponding author

The submitting author is automatically designated as the corresponding author in the submission system. The corresponding author is the primary contact for the journal office and the only author able to view or change the manuscript while it is under editorial consideration.

The corresponding author role may be transferred to another coauthor. However, note that transferring the corresponding author role also transfers access to the manuscript. (To designate a new corresponding author while the manuscript is still under consideration, watch the video tutorial below.)

Only one corresponding author can be designated in the submission system, but this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication. Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include its name in the manuscript byline. Do not add it to the author list in the submission system. You may include the full list of members in the Acknowledgments or in a supporting information file.

PubMed only indexes individual consortium or group author members listed in the article byline. If included, these individuals must qualify for authorship according to our [criteria](#).

Author contributions

Provide at minimum one contribution for each author in the submission system. Use the CRediT taxonomy to describe each contribution. [Read the policy and the full list of roles.](#)

Contributions will be published with the final article, and they should accurately reflect contributions to the work. The submitting author is responsible for completing this information at submission, and we expect that all authors will have reviewed, discussed, and agreed to their individual contributions ahead of this time.

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system.

The cover letter should address the following questions:

- Why is this manuscript suitable for publication in *PLOS Neglected Tropical Diseases*?
- Why will your study inspire the NTDs community, and how will it drive the understanding of NTD pathobiology, epidemiology, prevention, treatment, control, or policy?

The cover letter will only be available to the editor and the journal staff.

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract succinctly introduces the paper. It should not exceed 250-300 words. It should mention the techniques used without going into methodological detail and summarize the most important results with important numerical results given.

The Abstract is conceptually divided into the following three sections with these headings: Background, Methodology/Principal Findings, and Conclusions/Significance.

Do not include any citations in the Abstract. Avoid specialist abbreviations.

Author Summary

We ask that all authors of research articles include a 150- to 200-word non-technical summary of the work, immediately following the Abstract. Subject to

editorial review and author revision, this short text is published with all research articles as a highlighted text box.

Distinct from the scientific abstract, the Author Summary should highlight where the work fits in a broader context of life science knowledge and why these findings are important to an audience that includes both scientists and non-scientists. Ideally aimed to a level of understanding of an undergraduate student, the significance of the work should be presented simply, objectively, and without exaggeration.

Authors should avoid the use of acronyms and complex scientific terms and write the author summary using the first-person voice. Authors may benefit from consulting with a science writer or press officer to ensure that they effectively communicate their findings to a general audience.

Introduction

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

Methods

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. Detailed methodology or supporting information relevant to the methodology can be published on our web site.

This section should also include a section with descriptions of any statistical methods employed. These should conform to the criteria outlined by the Uniform Requirements, as follows:

Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to judge its appropriateness for the study and to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Avoid relying solely on statistical hypothesis testing, such as P values, which fail to convey important information about effect size and precision of estimates. References for the design of the study and statistical methods should be to standard works when possible (with pages stated). Define statistical terms, abbreviations, and most symbols. Specify the statistical software package(s) and versions used. Distinguish prespecified from exploratory analyses, including subgroup analyses.

Submit detailed protocols for newer or less established methods. Well-established protocols may simply be referenced. Protocol documents for clinical

trials, observational studies, and other **non-laboratory** investigations may be uploaded as supporting information.

We recommend and encourage you to deposit **laboratory protocols** in [protocols.io](https://www.protocols.io), where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs).

To include a link to a protocol in your article:

1. Describe your step-by-step protocol on protocols.io
2. Select **Get DOI** to issue your protocol a persistent digital object identifier (DOI)
3. Include the DOI link in the Methods section of your manuscript using the following format provided by protocols.io:
[http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.\[PROTOCOL DOI\]](http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.[PROTOCOL DOI])

At this stage, your protocol is only visible to those with the link. This allows editors and reviewers to consult your protocol when evaluating the manuscript. You can make your protocols public at any time by selecting **Publish** on the protocols.io site. Any referenced protocol(s) will automatically be made public when your article is published.

Results

The Results section should include all relevant positive and negative findings. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. The Results section should be written in past tense.

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception.

Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories.](#)

For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within [supporting information files](#) accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).

For more information on how best to provide data, read our [policy on data availability](#). PLOS does not accept references to “data not shown.”

As outlined in the [Uniform Requirements](#), authors that present statistical data in the Results section should do the following:

Discussion

The Discussion should be concise and tightly argued. It should start with a brief summary of the main findings. It should include paragraphs on the generalizability, clinical relevance, strengths, and limitations of your study.

You may wish to discuss the following points also:

- How do the conclusions affect the existing knowledge in the field?
- How can future research build on these observations and what are the key experiments that must be done?

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

PLOS journals publicly acknowledge the indispensable efforts of our editors and reviewers on an annual basis. To ensure equitable recognition and avoid any appearance of partiality, do not include editors or peer reviewers—named or unnamed—in the Acknowledgments.

Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the submission system.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- Published or accepted manuscripts
- Manuscripts on preprint servers, providing the manuscript has a citable DOI or arXiv URL.

Do not cite the following sources in the reference list:

- Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., “We used the techniques developed by our colleagues [19] to

analyze the data”). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the “Vancouver” style. Example formats are listed below. Additional examples are in the [ICMJE sample references](#).

Journal name abbreviations should be those found in the [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\) databases](#).

Supporting information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 20 MB in size.

Authors may use almost any description as the item name for a supporting information file as long as it contains an “S” and number. For example, “S1 Appendix” and “S2 Appendix,” “S1 Table” and “S2 Table,” and so forth.

Supporting information files are published exactly as provided, and are not copyedited.

Supporting information captions

List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

In-text citations

We recommend that you cite supporting information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite supporting information in the text, citations do not need to be in numerical order.

Source	Format
Published articles	<p>Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet Mol Res</i>. 2011;10: 1576-1588.</p> <p>Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. <i>Mol Immunol</i>. 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005.</p> <p>Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers. When providing a DOI, adhere to the format in the example above with both the label and full DOI included at the end of the reference (doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005). Do not provide a shortened DOI or the URL.</p>
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute “Forthcoming” for page numbers or DOI.
Online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health</i> . 2005;1: 14. Available from: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14
Books	Bates B. <i>Bargaining for life: A social history of tuberculosis</i> . 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. <i>AIDS and the historian</i> . Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	<p>Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity. arXiv:1403.3301v1 [Preprint]. 2014 [cited 2014 March 17]. Available from: https://128.84.21.199/abs/1403.3301v1</p> <p>Kording KP, Mensh B. Ten simple rules for structuring papers. <i>BioRxiv</i> [Preprint]. 2016 bioRxiv 088278 [posted 2016 Nov 28; revised 2016 Dec 14; revised 2016 Dec 15; cited 2017 Feb 9]: [12 p.]. Available from: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/088278v5 doi: 10.1101/088278</p>
Published media (print or online newspapers and magazine articles)	Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. <i>The New York Times</i> . 2014 Jan 29 [Cited 2014 March 17]. Available from: http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html

Figures and Tables

Figures

You can include figures in the main manuscript file at initial submission. If the manuscript reaches the revise stage, prepare and submit each figure as an individual file.

New media
works) Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS (blogs, web sites, Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available or other written from: <http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/>.

Masters' theses
or dissertations Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly or doctoral journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: <http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09>

Databases and repositories
(Figshare, arXiv) Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: [http://figshare.com/articles/QPX Genome Browser Feature Tracks/701214](http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214)

Multimedia
(videos, movies, or TV shows) Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

Cite figures in ascending numeric order at first appearance in the manuscript file.

Figure captions

Insert figure captions in manuscript text, immediately following the paragraph where the figure is first cited (read order). Don't include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- A figure label with Arabic numerals, and "Figure" abbreviated to "Fig" (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g. a figure citation of "Fig 1" must refer to a figure file named "Fig1.tif").
- A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., "Table 1") and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

[Read the guidelines for tables.](#)

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones..

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include [Dryad](#) and [FlowRepository](#). Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- Deposit data in the integrated repository of choice.
- Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data.
- Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section.

If you have any questions, please [email us](#).

Accession numbers

All appropriate data sets, images, and information should be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories](#).

Accession numbers (and version numbers, if appropriate) should be provided in the Data Availability Statement. Accession numbers or a citation to the DOI should also be provided when the data set is mentioned within the manuscript.

In some cases authors may not be able to obtain accession numbers or DOIs until the manuscript is accepted; in these cases, the authors must provide these numbers at acceptance. In all other cases, these numbers must be provided at full submission.

Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- [Ensembl](#)
- [Entrez Gene](#)
- [FlyBase](#)
- [InterPro](#)
- [Mouse Genome Database \(MGD\)](#)
- [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)
- [PubChem](#)

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.

Small and macromolecule crystal data

Manuscripts reporting new and unpublished three-dimensional structures must include sufficient supporting data and detailed descriptions of the methodologies used to allow the reproduction and validation of the structures. All novel structures must have been deposited in a community endorsed database prior to submission (please see our list of [recommended repositories](#)).

Small molecule single crystal data

Authors reporting X-Ray crystallographic structures of small organic, metal-organic, and inorganic molecules must deposit their data with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), or similar community databases providing a recognized validation functionality. Authors are also required to include the relevant structure reference numbers within the main text (e.g. the CCDC ID number), as well as the crystallographic information files (.cif format) as Supplementary Information, along with the checkCIF validation reports that can be obtained via the International Union of Crystallography (IUCr).

Macromolecular structures

Authors reporting novel macromolecular structures must have deposited their data prior to submission with the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), the Electron Microscopy Data Bank (EMDB), or other community databases providing a recognized validation functionality. Authors must include the structure reference numbers within the main text and submit as Supplementary Information the official validation reports from these databases.

Striking image

You can upload a visually striking image alongside your submission, which we may use to showcase your article through PLOS' online channels. We choose the monthly issue image from the striking images submitted with articles scheduled for publication.

Submission Criteria

- Choose an image that represents the article in a striking and eye-catching way.
- It can be derived from a figure or supporting information file from the paper, and it may be a cropped portion of an image or the entire image.
- Alternatively, you can create or source an image, as long as it adheres to our CC BY license.
- High resolution: between 300-600 dpi
- Single panel
- Ideally avoid added details like text, scale bars, and arrows.

How to Submit

1. Submit your striking image to the submission system using the file type "Striking Image".
2. Upload a separate file with the corresponding caption.

If no striking image is uploaded, a member of the journal team will choose an appropriate image, which may be a figure from the submission or a separately sourced CC BY image.

Additional Information Requested at Submission

Financial Disclosure Statement

This information should describe sources of funding that have supported the work. If your manuscript is published, your statement will appear in the Funding section of the article.

Include your statement in the Financial Disclosure section of the initial submission form.

The statement should include:

- Specific grant numbers
- Initials of authors who received each award
- URLs to sponsors' websites

Also state whether any sponsors or funders (other than the named authors) played any role in:

- Study design
- Data collection and analysis
- Decision to publish
- Preparation of the manuscript

If they had no role in the research, include this sentence: “The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.”

If the study was unfunded, include this sentence as the Financial Disclosure statement: “The author(s) received no specific funding for this work.”

Competing interests

The corresponding author is asked at submission to declare, on behalf of all authors, whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the work.

Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles.

[Read our policy on competing interests.](#)

Related manuscripts

When submitting a manuscript, all authors are asked to indicate that they do not have a related or duplicate manuscript under consideration (or accepted) for publication elsewhere. If related work has been or will be submitted elsewhere or is in press elsewhere, then a copy must be uploaded with the article submitted to PLOS. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

Preprints

PLOS encourages authors to post preprints as a way to accelerate the dissemination of research and supports authors who wish to share their work early and receive feedback before formal peer review. Deposition of manuscripts with preprint servers does not impact consideration of the manuscript at any PLOS journal.

Authors posting on [bioRxiv](#) or [medRxiv](#) may submit directly to relevant PLOS journals through the direct transfer to journal service.

Authors submitting manuscripts in the life sciences to *PLOS Neglected Tropical Diseases* may opt-in to post their work on bioRxiv during the *PLOS Neglected Tropical Diseases* initial submission process.

Reviewer and editor suggestions

We ask authors to suggest suitable editors and at least four potential reviewers when submitting their manuscript. Bear in mind any potential competing interests when making these suggestions. It is not appropriate to suggest recent collaborators or other researchers at your institution. See our [policy on competing interests](#) for more information.

Guidelines for Specific Study Types

Human and animal research

All research involving humans and animals must have been approved by the authors' institutional review board or equivalent committee(s), and that board must be named by the authors in the manuscript. For research involving human participants, informed consent must have been obtained (or the reason for lack of consent explained, e.g. the data were analyzed anonymously) and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the [Declaration of Helsinki](#). It must be stated in the Methods section of the paper whether informed consent was written or oral. If informed consent was oral, it must be stated in the paper: (a) why written consent could not be obtained, (b) that the IRB approved the use of oral consent, and (c) how oral consent was documented.

Authors should be able to submit, upon request, a statement from the research ethics committee or institutional review board indicating approval of the research. We also encourage authors to submit a sample of a patient consent form, and may require submission on particular occasions.

All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. In accordance with the recommendations of the Weatherall report, [The use of non-human primates in research](#), we specifically require authors to include details of animal welfare and steps taken to ameliorate suffering in all work involving non-human primates. The institution that approved the study must be named, and it must be stated in the paper that the study was conducted adhering to the institution's guidelines for animal husbandry.

Patient privacy and informed consent for publication

Our human participant policy conforms to the [Uniform Requirements](#) of the International Committee of Medical Journal Editors:

Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published. Complete anonymity is difficult to achieve, and informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. If data are changed to protect anonymity, authors should provide assurance that

alterations of the data do not distort scientific meaning. When informed consent has been obtained it should be indicated in the published article.

For papers that include identifying information, or potentially identifying information, authors must download the *Consent Form for Publication in a PLOS Journal* (below), which the patient, parent, or guardian must sign once they have read the paper and been informed about the terms of the PLOS content license.

Once authors have obtained the signed consent form, it should be filed securely in the patient's case notes and the manuscript submitted to PLOS should include this statement indicating that specific consent for publication was obtained: "The patients in this manuscript have given written informed consent (as outlined in the PLOS consent form) to publication of their case details."

Clinical trials

PLOS follows the World Health Organization's (WHO) definition of a clinical trial:

A clinical trial is any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes [...] Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioural treatments, process-of-care changes, preventive care, etc.

Registering Clinical Trials

All clinical trials submitted to PLOS journals must be entered in a publicly accessible registry approved by the WHO or ICMJE. See the list of approved registries.

PLOS journals consider prospective trial registration (that is, registration before participant enrollment has begun) to be best publication practice, as recommended by the ICMJE. Clinical trials that began to enroll participants before ICMJE recommendations took effect on July 1, 2005 may be retrospectively registered.

PLOS Neglected Tropical Diseases is unlikely to publish clinical trials that are not prospectively registered. We recognize, however, that in rare cases late registration may occur for exceptional reasons that merit consideration. Authors seeking evaluation by *PLOS Neglected Tropical Diseases* of a non-prospectively registered clinical trial must provide a compelling reason for lack of prospective registration.

In addition, as for all PLOS journals, authors wishing to submit a clinical trial that was not publicly registered before participant enrollment began must register the trial retrospectively in a publicly accessible registry. They must also:

- Register all related clinical trials and confirm they have done so in the Methods section

- Explain in the Methods the specific reasons for failing to register before participant enrollment
- Confirm that future trials will be registered prospectively

PLOS journal editors may decline to further consider any clinical trial for which, in the editor's judgment, absence of prospective registration raises concerns of selective publication or selective reporting of research outcomes.

PLOS supports the public disclosure of all clinical trial results, as mandated, for example, by the 2007 FDA Amendments Act. Prior disclosure of results on a clinical trial registry site will not affect consideration.

Required Documentation

Clinical trial reports must adhere to the relevant reporting guidelines for their study design, such as CONSORT for randomized controlled trials, TREND for non-randomized trials, and other specialized guidelines as appropriate.

For all clinical trial submissions, authors must include the following:

- Registration details (reported in the Methods section and in the submission form)
- CONSORT checklist or relevant reporting guideline (uploaded as supporting information)
- CONSORT flow diagram (uploaded as Fig 1)
- Trial protocol (uploaded as supporting information)
- Details of prior approval for human subjects research by an institutional review board (IRB) or equivalent ethics committee(s)

The submission will not be considered if documentation is not provided. The checklist, flow diagram, and protocol will be published with the article if the manuscript is accepted.

The manuscript file must include the following information:

- An explanation of any deviation from the trial protocol
- Description of informed consent obtained from participants
- Any information on statistical methods or participants not indicated in the CONSORT documentation

Systematic reviews and meta-analyses

Submissions with systematic reviews and meta-analyses are considered research articles. Submit these manuscripts with the "Research Article" type in the submission system.

Reports of systematic reviews and meta-analyses must adhere to the PRISMA Statement or alternative guidelines appropriate to the study design, and include the completed checklist and flow diagram to accompany the main text. Authors

must complete the appropriate reporting checklist not only with page references, but also with sufficient text excerpted from the manuscript to explain how they accomplished all applicable items.

Abstracts should follow PRISMA for Abstracts, using the PLOS abstract format. Authors must also state within the Methods section of their paper whether a protocol exists for their systematic review, and if so, provide a copy of the protocol as supporting information.

The journal supports the prospective registration of systematic reviews. Authors whose systematic review was prospectively registered (e.g., in a registry such as [PROSPERO](#)) should provide the registry number in their abstract. Registry details and protocols will be made available to editors and reviewers, and included with the paper if the report is ultimately published.

Diagnostic studies

Reports of studies of diagnostic accuracy must adhere to the [STARD requirements](#) or alternative guidelines appropriate to the study design (see the [EQUATOR web site](#)) and include a completed checklist as supporting information. Authors must complete the appropriate reporting checklist not only with page references, but also with sufficient text excerpted from the manuscript to explain how they addressed all applicable items.

Observational studies

For observational studies, including case control, cohort, and cross-sectional studies, authors must adhere to the [STROBE Statement](#) or alternative guidelines appropriate to the study design (see the [EQUATOR web site](#)) and include a completed checklist as supporting information. Authors must complete the appropriate reporting checklist not only with page references, but also with sufficient text excerpted from the manuscript to explain how they addressed all applicable items.

For observational studies, authors are required to clearly specify (a) What specific hypotheses the researchers intended to test, and the analytical methods by which they planned to test them; (b) What analyses they actually performed; and (c) When reported analyses differ from those that were planned, authors must provide transparent explanations for differences that affect the reliability of the study's results.

If a prospective analysis plan (from the study's funding proposal, IRB or other ethics committee submission, study protocol, or other planning document written before analyzing the data) was used in designing an observational study, authors must include the relevant prospectively written document with the manuscript submission for access by editors and reviewers and eventual publication alongside the accepted paper. If no prospectively written document exists, authors should explain how and when they determined the analyses being reported.

Microarray experiments

Reports of microarray experiments must conform to the [MIAME guidelines](#), and the data from the experiments must be deposited in a publicly accessible database.

Other Article Types

If you are submitting content other than a research article, [read the guidelines for other article types](#).