



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM CÃES COM INFECÇÃO
NATURAL *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, SUBMETIDOS A
TRATAMENTO EXPERIMENTAL**

GLAUCIA GRAZIELLE NASCIMENTO

**RECIFE – PE
2015**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

GLAUCIA GRAZIELLE NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM CÃES COM INFECÇÃO
NATURAL *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, SUBMETIDOS A
TRATAMENTO EXPERIMENTAL**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Leucio Câmara Alves

**RECIFE – PE
2015**

Ficha Catalográfica

N244a Nascimento, Glaucia Grazielle
Avaliação da carga parasitária na pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* submetidos a tratamento experimental / Glaucia Grazielle Nascimento. -- Recife, 2015.
88 f.: il.

Orientador(a): Leucio Câmara Alves.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2015.

Inclui apêndice(s) e referências.

1. Leishmaniose visceral canina 2. *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi* 3. Clínica de Pequenos animais I. Alves, Leucio Câmara, orientador II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM CÃES COM INFECÇÃO
NATURAL *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, SUBMETIDOS A
TRATAMENTO EXPERIMENTAL**

GLAUCIA GRAZIELLE NASCIMENTO

Aprovada em _____ de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE
Orientador

Dr. Júlio Rodrigues Pereira Júnior

Médico Veterinário

Prof^a. Dr^a. Márcia Paula Oliveira Farias

Universidade Federal do Piauí - UFPI

Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto

Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Dedicatória

*... A Deus por ser minha fonte de força para continuar lutando.
Aos animais deste experimento, por ter me dado à oportunidade de
aprender mais.*

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida, por guiar meus caminhos, me abençoando e me dando forças para que eu chegasse até o fim.

A minha mãe, por entender a minha constante luta para alcançar meus sonhos, pelas suas orações, e com o seu amor me ajudou a nunca desistir. E ao meu pai, pelo seu apoio nas madrugadas que precisei viajar, obrigado pelo seu carinho.

Aos meus irmãos Nelson Nascimento e Gleicy Nascimento, por permanecerem sempre ao meu lado, pois sei, que a cada conquista alcançada é nossa. Vocês são partes do meu coração que vivem fora de mim. Amo vocês.

Ao professor Leucio Câmara Alves, pela oportunidade, confiança, pelo aprendizado e principalmente obrigado pelo carinho. Não esquecerei jamais os ensinamentos, e a força que me foi dada para continuar. Deus continue lhe abençoando.

Ao meu amigo-irmão Edson Moura, obrigado por todo carinho e pelas palavras de incentivo, você é muito importante para mim.

Ao professor Wagner Porto, pois sem ele não teria tido a oportunidade de ingressar no LDP, obrigado por tudo, és um exemplo de pessoa boa e competente.

As duas mães que Deus me deu, Márcia Paula e Erenilda Alves, não tenho palavras para expressar o quanto vocês são importantes para mim. Obrigado por todo o apoio e carinho.

Ao meu companheiro de pesquisa e amigo Julio Rodrigues, obrigado pelos momentos de convivência ao seu lado, pois através deles, tive a oportunidade de está ao lado de uma pessoa maravilhosa que tanto respeito e admiro.

A João Carlos, por me mostrar que a vida é muito mais do aquilo que pensamos ser. Meu amigo, não tenho palavras para agradecer a sua amizade, você é uma das pessoas mais incríveis que conheci.

Ao amigo Augusto Valença, superamos limites durante essa caminhada. Obrigado pelo companheirismo e pela sua amizade. Torço muito por você... Sentirei muitas saudades.

A Sandra Torres, Flaviana Wanderley, Edna Sá, Francine França, Débora Viegas, Lorena Vescovi, Débora Rochelly, Luciana Ghinato e Gerci Nascimento, obrigado às minhas grandes amigas, sem vocês tudo ficaria mais difícil. Obrigado pelas palavras de conforto, pelo aprendizado e por não ter me deixado só nessa caminhada.

A Neurisvan Guerra e Vinícius Vasconcelos, dois amigos que tanto admiro. Obrigado pela solidariedade em me ajudar no experimento, e principalmente pela amizade que cultivamos ao longo dessa jornada.

A professora Dr.a. Maria Aparecida da Glória Faustino, pela contribuição com seu conhecimento durante essa jornada no LDP. Obrigado pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos demais amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos: Andrea Calado, Victor Fernando, Nadine Louise, Carlos Diógenes, Hévila Sandes, Inês Cavalcanti, Fernanda Monteiro, Maria Luiza, Silvia Marques, Rodrigo, Rodolfo Godoy, Gisele Ramos, Jussara Valença, Cristiane Maia, Caroline Messias e Ivanise Santana, que durante todo esse tempo de convivência foram a minha família, tornando os meus dias melhores, pois foi muito bom ter conhecido vocês, obrigado pelos conselhos, ajuda e carinho.

Aos tutores e os animais, sem eles não seria possível realizar essa pesquisa, obrigado pela dedicação e contribuição, pois o sucesso foi primeiramente de vocês.

A minha coordenadora da VISA, Katiúscia Mineli, por me ajudar nos momentos que tive que ficar ausente, pois sem sua compreensão não seria possível à conclusão desse trabalho, agradeço a Deus por ter colocado pessoas como você no meu caminho. Que o Senhor te retribua em bênçãos! Obrigado por tudo.

A Atzel Abda, pela grande contribuição com sua ajuda conhecimento no processamento das amostras. E ao prof. Dr. Rinaldo Mota, pelo apoio disponibilizando o Laboratório de Doenças Infeciosas e principalmente pelas palavras de incentivo.

A todos os funcionários do departamento de Medicina Veterinária da UFRPE- PE, que contribuem para que tudo funcione da melhor forma.

A FACEPE pela bolsa de estudos que proporcionou as condições necessárias para cursar o mestrado.

A vocês minha eterna gratidão...

“A única coisa que importa, é colocar em prática com, sinceridade e seriedade, aquilo em que se acredita”.

Dalai Lama

AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, SUBMETIDOS A TRATAMENTO EXPERIMENTAL

RESUMO - A Leishmaniose Visceral Canina é uma doença que tem como agente etiológico no Brasil a espécie do protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, endêmica em várias regiões, transmitida pelo inseto-vetor *Lutzomyia longipalpis*. O cão doméstico é considerado o mais importante reservatório do parasita. O objetivo deste trabalho foi avaliar a carga parasitária em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum chagasi* submetidos a tratamento experimental. Para tanto utilizou-se 18 cães sintomáticos, naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi* de ambos os sexos, idades variadas submetidos a protocolo de tratamento com alopurinol 10 mg/kg a cada 12h horas, domperidona 1 mg/kg a cada 24 horas, durante doze meses, associado com a vacina inativada, três doses com intervalo de 21 dias, por via subcutânea, na diluição de duas partes do liofilizado para uma do diluente. Os animais foram submetidos à avaliação clínica, testes hematológicos, bioquímicos, imuno-histoquímica de pele e monitoramento através da Reação em Cadeia da Polimerase, nos momentos zero (M0), seis meses (M6) e doze meses (12M). Houve remissão significativa dos sinais clínicos em 100% (18/18) dos cães nos momentos pós-tratamento, bem como normalização e melhora dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Na imuno-histoquímica da pele, houve redução significativa e eliminação dos parasitos na pele entre os momentos. Na PCR foi detectado DNA do parasita nas amostras de pele e medula óssea após doze meses de tratamento, embora com redução significativas entre os momentos pré e pós-tratamento. Os resultados deste trabalho concluem que o tratamento com alopurinol e domperidona associado com a vacina inativada, promove a remissão dos sinais clínicos e redução da carga parasitária em animais com leishmaniose visceral.

Palavras-chaves: *Lutzomyia longipalpis*, alopurinol, vacina

**PARASITE LOAD EVALUATION IN DOGS NATURALLY INFECTED WITH
Leishmania (Leishmania) infantum chagasi SUBMITTED TO
EXPERIMENTAL TREATMENT**

ABSTRACT - The Canine Visceral Leishmaniasis is a disease whose etiological agent in Brazil is the species of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, endemic in several regions, transmitted by insect-vector *Lutzomyia longipalpis*. The domestic dog is considered the most important parasite reservoir. This study aimed to evaluate the parasite load in dogs naturally infected with *Leishmania (L.) infantum chagasi* submitted to experimental treatment. For this purpose we used 18 asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (L.) infantum chagasi* of both sexes, various ages submitted to treatment protocol with allopurinol 10 mg / kg 12h hours, domperidone 1 mg / kg every 24 hours during twelve months, associated with inactivated vaccine, three doses at 21 days interval by the subcutaneous route at a dilution of lyophilized to two parts of a diluent. The animals were submitted to clinical evaluation, blood tests, biochemical, immunohistochemistry of skin and monitoring through the Polymerase Chain Reaction in moments zero (M0), six months (M6) and twelve months (12M). Were observed significant remission of clinical signs in 100% (18/18) of the dogs in the post-treatment times, as well as standardization and improvement of haematological and biochemical parameters. In immunohistochemistry the skin, there was a significant reduction and elimination of parasites in the skin between times. PCR detected DNA of the parasite in skin samples and bone marrow after twelve months of treatment, with significant reduction between the pre- and post-treatment. The results of this study conclude that the treatment with allopurinol and domperidone associated with inactivated vaccine, to promote remission of clinical signs and reduction of parasite burden in animals with visceral leishmaniasis.

Keywords: *Lutzomyia longipalpis*- allopurinol – vaccine

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 2

FIGURA 1 Na seta vermelha imunomarcção de formas amastigotas de *L.* 65
(L.) infantum chagasi na pele cão no M0 (A); – IHQ negativa de
pele de cão no M12 (B).

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1 Frequência dos sinais clínicos dos cães pré e pós-tratamento. 50

TABELA 2 Comparação entre os resultados obtidos no hemograma pré e pós-tratamento de cães com LV. 51

TABELA 3 Comparação dos resultados obtidos da bioquímica sérica de cada momento de cães com LV submetidos a protocolo de tratamento experimental. 52

ARTIGO 2

TABELA 1 Resultados da quantificação da carga parasitária nas amostras de pele de cães com LV antes (M0) e após os tratamentos (M6 e M12). Método de imuno-histoquímica 66

ARTIGO 3

TABELA 1 Frequência de cães positivos na PCR em diferentes amostras biológicas pré e pós-tratamento. 79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 - Leishmaniose Visceral	18
2.2 - Agente Etiológico, Vetor e Transmissão	18
2.3 – Ciclo Biológico	19
2.4 - Imunopatogenia	19
2.5 - Sinais Clínicos	21
2.4– Alterações Hematimétricas e Bioquímicas	22
2.5 – Diagnóstico	22
2.5.1 - Exame Parasitológico	23
2.5.2 - Métodos sorológicos	23
2.5.3 – Moleculares	24
2.6 – Tratamento	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
4. OBJETIVOS	41
4.1. Objetivo Geral	41
4.2. Objetivos Específico	41
ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE CÃES (<i>CANIS FAMILIARIS</i>) NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> SUBMETIDOS A TRATAMENTO EXPERIMENTAL	42
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4. CONCLUSÃO	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA NA PELE DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania) infantum chagasi</i> SUBMETIDOS A TRATAMENTO EXPERIMENTAL	57
RESUMO	58

ABSTRACT	59
1- INTRODUÇÃO	60
2 – MATERIAL E MÉTODOS	61
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4 – CONCLUSÃO	66
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ARTIGO 3- UTILIZAÇÃO DA REAÇÃO DA CADEIA EM POLIMERASE NO MONITORAMENTO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM ALUPORINOL, DOMPERIDONA E VACINA	71
RESUMO	72
ABSTRACT	73
1 - INTRODUÇÃO	74
2 – MATERIAL E MÉTODOS	74
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4 – CONCLUSÃO	79
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
6 - APÊNDICE	85

1 - INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose de importância em Saúde Pública em vários países, causada no Novo Mundo pela espécie de protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005; LAINSON, 2010). É transmitida pelo mosquito-pólvora do gênero *Lutzomyia*. Os cães no ambiente urbano representam um importante reservatório doméstico no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral (ALVAR, et. al. 2004; VERÇOSA, et.al. 2008; OTRANTO; DANTAS-TORRES, et al., 2013;).

No Brasil a LVC está amplamente distribuída nas zonas rural, peri-urbana e urbana e possui alta incidência, devido a mudança no padrão epidemiológico de transmissão (COSTA-VAL et al., 2007; GONTIJO; MELO 2004; WHO 2010). Com a urbanização da doença, as estratégias de controle são baseadas na realização do tratamento de humanos infectados e a eutanásia de cães portadores da LV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Porém medidas de controle da doença até agora implementadas foram incapazes de eliminar a transmissão e impedir a ocorrência de novas epidemias (GONTIJO; MELO 2004).

As manifestações clínicas da doença em cães variam de acordo com a patogenicidade da cepa do parasita, que difere entre as espécies, e com as respostas imunológicas celulares do hospedeiro. As lesões de pele são os sinais clínicos mais comuns, podendo ocorrer dermatite esfoliativa, papular, nodular, ulcerativa e alopecica (CIAREMELLA; CORONA, 2003; NOLI; AUXILIA, 2005;). Já aos sinais sistêmicos incluem linfadenopatia, oftalmopatia, problemas articulares, epitaxex e atrofia muscular. Além disso, alterações nos exames laboratoriais como trombocitopenia, anemia arregenerativa (BANETH, 2006;), aumento dos valores de uréia, creatinina, fosfatase alcalina (FA) e alanina aminotransferase (ALT) são frequentemente relatados.

Embora o tratamento de LV em cães já tem sido realizado há muito tempo na Europa (ALVAR et. al., 1994; BANETH et al., 2001; NOLI; AUXILIA, 2005), mas no Brasil poucas pesquisas têm sido executadas para avaliar a eficácia de diferentes protocolos terapêuticos.

A utilização de fármacos na LVC tem demonstrado a redução do parasitismo cutâneo, eliminação dos sinais clínicos, e principalmente, a recuperação da resposta imunológica que controla a infecção, diminuindo a capacidade infectante do inseto-vetor, e o número de casos de LV em cães e humanos, principalmente em áreas endêmicas (RIBEIRO, et al., 2002; SOLANO-GALLEGO et al, 2009 MAROLI et al., 2010; OLIVA et al., 2010; BANETH, 2013; ROURA et al., 2013).

As restrições com o uso da terapia antimonial em cães, com a hipótese do surgimento da resistência parasitária (BANETH; SHAW, 2002; GOMEZ-OCHOA, et al., 2009), o alto custo, a toxicidade, e a proibição, no Brasil, confirmam a necessidade de buscar alternativas para o controle da LV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Tendo em vista essa problemática, este estudo teve como objetivo avaliar a carga parasitária em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submetidos a tratamento experimental.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença crônica e fatal decorrente do parasitismo por diversas espécies de protozoários, do gênero *Leishmania* sp, que acometem diferentes espécies de mamíferos domésticos e silvestres e o homem, vetores e reservatórios, constituindo uma das doenças de importância mundial (PIMENTA et.al., 2003; MICHALICK;GENARO, 2005; PALTRINIERI, et al., 2010; WHO, 2010).

No Brasil o processo migratório de cães infectados de regiões endêmicas para áreas não endêmicas, mudanças no habitat natural de hospedeiros e vetores, através do desmatamento para construção de residenciais e indústrias (XIMENES et al., 2007 ; VERÇOSA, et.al., 2008; COLOMBO et.al. 2011), tem mudado o perfil de ocorrência da LV apresentando em algumas cidades brasileiras a urbanização doença.

Neste contexto, o cão assume grande importância como reservatório (ALVAR et al., 2004; BANETH, 2008; VERÇOSA et.al., 2008; GRAMICCIA, 2011), devido a alta prevalência da doença nestes animais, pelo exacerbado parasitismo cutâneo e pela sua proximidade ao homem (ALVES, 2006; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; DANTAS-TORRES, 2007; VERÇOSA et.al., 2008).

2.1 – Agente Etiológico, Vetor e Transmissão

A LV é causada por um protozoário pertencente à ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ASHFORD, 2000; LAINSON; RANGEL, 2005; LIMA et.al., 2010; COLOMBO et.al. 2011; GRAMICCIA, 2011; LAURENTI, 2013) com 21 espécies consideradas como patogênicas (ASHFORD, 2000).

No novo mundo, o agente etiológico da LV era denominado *Leishmania chagasi* e no velho mundo, *Leishmania infantum chagasi* (FEITOSA, 2006). Contudo, pesquisas comprovaram que do ponto de vista bioquímico e genético trata-se da mesma espécie, havendo a distinção apenas quanto à nomenclatura (GOTIJO; MELO, 2004; KULHS, et al., 2011).

Sendo assim, Lainson e Shaw (2005) propuseram uma nova classificação do subgênero *Leishmania*, dividindo *Leishmania (L.) infantum* em duas subespécies: *L. (L.) infantum infantum* (Velho Mundo) e *L. (L.) infantum chagasi* (Novo Mundo).

No Brasil, a principal forma de transmissão ocorre por meio picada das fêmeas dos vetores flebotomíneos no momento do repasto sanguíneo, na qual a *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005) é o principal vetor, além de outras espécies como além de *Lu. migonei* no estado de Pernambuco (CARVALHO et al., 2010) e *Lu. cruzi* nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (DOS-SANTOS et al., 1998; PITA-PEREIRA et al., 2008; MISSAWA et al., 2010) que são considerados vetores secundários.

2.3 - Ciclo Biológico

O ciclo biológico é do tipo heteroxeno, onde a infecção do hospedeiro invertebrado por *Leishmania (L.) infantum chagasi* normalmente ocorre através da picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (DANTAS-TORRES, 2012; BELO et al., 2013), popularmente conhecidos como mosquito palha, cangalhinha, birigui ou tatuquiras (ALVES; FAUSTINO, 2005). No Brasil, a principal espécie é a *Lutzomyia longipalpis*, a qual as fêmeas dessa espécie ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado ingerem células parasitadas com as formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, diferenciam no tubo digestivo para as formas promastigotas, estas por sua vez migrarão para as glândulas salivares do mosquito, que durante um novo repasto sanguíneo serão inoculadas em um outro hospedeiro (BRASIL, 2006)..

Após a alimentação do vetor, as promastigotas serão fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos diferenciam-se em formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Os macrófagos, repletos de amastigotas, rompem-se liberando essas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo (MICHALICK, 2005; PALTRINIERI, et al., 2010).

2.4 - Imunopatogenia

A patogenia da infecção canina é influenciada por diversos fatores envolvendo a relação parasito-hospedeiro, *status* imunológico (MARTINEZ,

et.al. 2009; REIS et.al., 2009; GRIMALDI et al. 2012) e nutricional do indivíduo. (CAMARGO, 2006; MARCONDES et.al. 2011).

A condição imunológica dos hospedeiros vertebrados em controlarem a infecção está relacionadas a dois fatores principais: habilidade da *Leishmania* sp em resistir às ações macrófagos ativadas e a inibição de resposta imune celular do hospedeiro (TORRES-NETO, et al., 2008). Além disso, aspectos inerentes ao vetor, como sua capacidade vetorial e exposição contínua do hospedeiro mamífero à saliva devido a repetidas picadas do inseto vetor (COURTENAY et. al., 2002; MORENO; ALVAR, 2002; VINHAS et al., 2007) também exercem importância no sucesso da infecção.

Após a inoculação das formas promastigotas, o parasitismo dos macrófagos inicia-se na pele, onde desencadeia uma reação inflamatória com presença de células mononucleares (MORENO et. al., 1999) seguido da disseminação do parasito por via hemática e linfática para todo o organismo, particularmente baço, linfonodos, fígado, e medula óssea (MORENO et al., 1999; PETERS, 2008).

Numa infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, as células do sistema mononuclear fagocitário infectadas atuam como células apresentadoras de antígenos, estimulando os linfócitos (CD4+) T auxiliares do tipo 1 (Ta1), ou T auxiliares do tipo 2 (Ta2) (REIS, et.al., 2009).

A ativação linfócitos Ta1 esta associada à resposta imune celular (FREITAS; PINHEIRO, 2010; CORTESE, 2013) com produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o interferon gama (IFN- γ), o fator de necrose tumoral (TNF) e a supressão da síntese da IL-12 com eliminação da infecção (FREITAS; PINHEIRO, 2010; CORTESE, 2013), enquanto que a produção de IL-4, (PINELLI et al, 1995) IL-10, TGF- β e prostaglandina PGE₂ (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998) estimulam Ta2 com produção de anticorpos (SEDER, 1994; BARCELLAR; CARVALHO, 2005; REIS et al., 2006; MAIA; CAMPINO, 2008; MESQUITA JUNIOR et al., 2010) encontra-se associada a doença clínica; LOPEZ et al, 1996, CIARAMELLA; CORONA, 2003; ROZE, 2005; BANETH, 2006; SONODA, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

A contínua produção de anticorpos em excesso causa uma hipergamoglobulinemia crônica, resultando na formação e deposição de

imunocomplexos que podem causar glomerulonefrites, poliartrites, vasculites, assim como produção de auto-anticorpos contra plaquetas e células da série vermelha (PALTRINIERI et al., 2010).

2.5 - Sinais Clínicos

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença crônica, fatal e sistêmica, podendo permanecer em um quadro assintomático ou apresentar uma doença progressiva com sinais clínicos variados (BRACHELENTE et al. 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; MARCONDES et al. 2011). Sendo assim de acordo com a sintomatologia apresentada os animais podem ser classificados como sintomáticos e assintomáticos (BLAVIER et al. 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; ALEXANDRE-PIRES, 2010).

Entre os principais sinais clínicos na LVC destacam-se as dermatopatias, caquexia (TAFURI et al., 2001; SOLANO GALLEGO et al., 2009; FIGUEIREDO, 2009; QUEIROZ et al. 2011), oftalmopatias (BRITO et al. 2004; LEITE et al. 2010), epistaxe, hepatoesplenomegalia, anemia, linfadenopatia, emaciação e onicogribose (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; BONATES, 2003; LIMA et al., 2004.; 2004; LANGONI et al., 2005; LINHARES et al., 2005; ALVES; FAUSTINO, 2005; KRAUSPENHAR et al., 2007).

As dermatopatias estão presentes em 60-90% dos cães com LV (FERRER et al., 1988; ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; BANETH, 2006), podendo ocorrer: dermatites esfoliativa, seborréica, papular, nodular e ulcerativa; pústulas; despigmentação nasal; hiperpigmentação; alopecia; hiperqueratose e descamação (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; BANETH, 2006; COSTA-VAL, 2004; FONDATI ; FONDEVITA; 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005).

Após as dermatopatias e a hipertrofia dos linfonodos poplíteos, os pré-escapulares e os submaxilares (BANETH, 2006; LIMA et al., 2004; SILVA, ET al., 2012; ATHANASIOU, et al. 2013; MARCONDES, et al., 2013; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014), constituem o achado clínico mais comum em pacientes com LVC (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; FERRER, 2002; LIMA et al., 2004; MARCONDES, et al., 2013).

Glomerulonefrites, em consequência de lesões tubulares e glomerulares resultantes da deposição de imunocomplexos (ALVAR et al., 2004; LUVIZOTTO, 2006) com o comprometimento da capacidade funcional normal do órgão, provocando um quadro de proteinúria, e síndrome nefrótica ou insuficiência renal crônica tem sido observada (FERRER, 1999; BONFANTI; ZATELLI, 2004).

L. (L.) infantum chagasi pode ainda desencadear lesões hepáticas, induzindo alterações na morfologia dos hepatócitos e conseqüentemente no metabolismo do órgão (ALVAR, et al, 2004), e uma desorganização na estrutura celular baço, com a hiperplasia da polpa branca e polpa vermelha do órgão determinando esplenomegalias em graus variados (ALVAR et al., 2004).

2.6 - Alterações Hematimétricas e Bioquímicas

No hemograma, as alterações mais comuns encontradas são trombocitopenia, anemia, linfopenia, (RIBEIRO, 2004; BANETH, 2006;) alguns animais apresentam leucocitose com desvio a esquerda regenerativo enquanto outros apresentam leucopenia ou mesmo perfil leucocitário normal (AMUSATEGUI et al., 2003; COSTA VAL, 2004).

No exame bioquímico pode apresentar níveis aumentados de uréia, creatina normal ou aumentada (FREITAS, 2012). Achados laboratoriais de hiperproteinemia, leucopenia associada a linfopenia ou leucocitose também são descritos (SONODA, 2007).

2.7 – Diagnóstico.

O diagnóstico preciso para LVC representa um grande desafio, uma vez que muitos cães infectados apresentam-se assintomáticos ou com sinais clínicos semelhantes a outras doenças (FERRER, 2002; ALVAR et al., 2004), sendo necessário a realização do diagnóstico laboratorial quer seja por métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (IKEDA; FEITOSA, 2007; MOREIRA et.al. 2007; PALTRINIERI et al., 2010; GRAMICCIA, 2011; SOLCÁ, et.al. 2012) isolados ou associados (ASSIS, et al., 2010).

2.7.1 - Exame Parasitológico

Os exames diretos são fundamentados na demonstração de formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em esfregaços de aspirados de medula óssea, baço, fígado, linfonodos. (ALVAR et al., 2004; PALTRINIERI et al. 2010) ou citologia esfoliativa. A especificidade deste método pode ser considerada 100%, pois, uma vez encontrado o parasito, confirma-se a infecção ALVAR et. al. 2004, GOTIJO; MELO, 2004; SARIDOMICHELAKIS et al. 2005; RODRÍGUEZ-CORTÉS et. al. 2010).

A técnica de Imuno-histoquímica (IHQ) é outro método parasitológico de diagnóstico que detecta indiretamente o parasitismo tecidual (FERRER et al., 1988; TAFURI et al., 2004; COSTA et al., 2008; MOURA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; TOPLU e AYDOGAN, 2011). Além de possuir boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico, ainda tem a vantagem de permitir uma análise quantitativa, a qual pode ser utilizada para acompanhamento da evolução da doença e de tratamentos específicos em animais infectados (TAFURI et al. 2004).

2.7.2 - Métodos sorológicos

Dentre os métodos sorológicos, que detectam anticorpos IgG anti- *L. (L.) infantum chagasi* a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), Fixação de Complemento (FC), teste de aglutinação direta, imunocromatográfico rápido (IKEDA; FEITOSA, et.al. 2007; REITHINGER; DAVIES, 2002; ASSIS et al., 2008; GRIMALDI JR et al. 2012), tem sido utilizado no diagnóstico da infecção.

Apesar da alta sensibilidade e especificidade a RIFI (LUVIZOTTO et. al., 2009), reações cruzadas com triponossomíase (ALVES; BEVILACQUA, 2004; BANETH; AROCH, 2008), erlichiose, babesiose e anaplasiose (LIRA, 2006) tem sido relatada, dificultando a aplicação desta técnica em regiões endêmicas para LVC (SUNDAR; RAI 2002, PORROZZI et al. 2007, MADEIRA et al. 2009).

O teste ELISA é considerado um importante avanço tecnológico para o diagnóstico da LVC, pois permite a avaliação de um grande número de amostras em um curto espaço de tempo.

Atualmente a imunocromatografia, a através da tecnologia Dual Path Platform (DPP), tem sido utilizado para o diagnóstico da infecção um teste

rápido, apresentando alta sensibilidade para cães com sinais clínicos e alta especificidade para cães sem expressão clínica para LV (GRIMALDI JR. et al. 2012).

2.7.3 - Métodos Moleculares

Nas últimas décadas os métodos moleculares têm mostrado ser uma ferramenta de grande valia no diagnóstico da infecção, com sensibilidade e especificidade altas próximas a 100%, principalmente para detecções em cães assintomáticos. Neste contexto, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), apresenta alta sensibilidade (80 a 93%) e especificidade 100% (NOLI, 1999; MARTIN-SANCHEZ et al., 2004; MAIA; CAMPINO, 2008)) na detecção de DNA de *L. (L.) infantum chagasi* em amostras de medula óssea, sangue periférico, aspirado de linfonodos e biópsia cutânea, e também do vetor (FERRER,1999; SOLANO-GALLEGO et al. 2007, TAVARES et al. 2003, GONTIJO, 2004, LUVIZOIT, 2005, MANNA et al. 2008, MARTINS, 2008; QUARESMA et al.,2009; QUEIROZ, 2010).

Com o surgimento Reação em Cadeia Polimerase em Tempo Real (qPCR), tornou-se possível mensurar a carga parasitária a partir de tecidos infectados de maneira mais precisa, possibilitando as aplicações tanto para o diagnóstico da LVC quanto para a avaliação do sucesso de tratamento quimioterápico em modelos experimentais (PENNISI et al. 2005, FRANCINO et al. 2006, MANNA et. al. 2008).

Esta técnica oferece muitas vantagens no diagnóstico e acompanhamento de animais em tratamento para LVC, especialmente, em áreas endêmicas, onde uma grande parte da população canina é exposta, mas somente uma pequena parte destes cães desenvolvem a forma clínica da doença (FRANCINO et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2001)

MANNA et. al. (2008) utilizaram a qPCR para monitorar o tratamento de cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi* , observando que antes da terapêutica 83,0% dos cães, apresentaram uma alta carga parasitária variando de 1000 a 10.000 parasitas/ μ l em aspirados de linfonodos, seguido por em 61,0% em amostras biópsias de pele.

A combinação da PCR com métodos sorológicos quantitativos tem sido recomendada para a confiabilidade do diagnóstico da LVC (SOLANO-GALLEGO et. al. 2009). Além disso, a associação da qPCR com a sorologia abre novas perspectivas para a avaliação das relações existentes entre a carga parasitária e a produção de anticorpos no hospedeiro (ALVES et al. 2009).

2.5 – Tratamento

O tratamento da LVC representa um desafio para o médico veterinário, devido à extrema complexidade de sua patogenia que se expressa pela variedade nos sinais clínicos. Desta forma a condição clínica do paciente é um fator que influencia na escolha do melhor protocolo terapêutico (ALVAR, et. al., 2004). Por outro lado o sucesso no tratamento ainda é tópico em discussão em função do critério de cura ou simplesmente remissão dos sinais clínicos.

Desta forma o tratamento da LVC tem sido descrito na tentativa de remissão dos sinais clínicos e redução na capacidade infectante dos animais (RHALEN, et. al., 1999; MARTINEZ-SUBIELA; CERON, 2005; NOLI; AUXILIA, 2005; IKEDA-GARCIA et al., 2007; IKEDA-GARCIA et al., 2010; SILVA, 2007; GOMEZ-ÚCHOA et al., 2009; CIARLINI et al., 2010; TRIGO et al., 2010; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Os fármacos que existem disponíveis para o tratamento na Europa Antimoniato de meglumina (NOLI; AUXILIA, 2005; MAROLI et al., 2010 e OLIVA et al., 2010; BANETH, 2013; ROURA et al., 2013), Estibogluconato de Sódio, Desoxicolato de Anfotericina B convencional ou encapsulada em lipossomas, o Sulfato de Aminosidina, o Alopurinol, Domperidona (GÓMEZ-OCHOA, et.al. 2007), Pentamidina e, recentemente, o Éster defosfatidilcolina do hexadecanol, associados ou não com vacinas (RIBEIRO, 2001; BANETH; SHAW, 2002; ALVAR et al., 2004; MIRÓ, 2005; NIETO et. al., 2005), sendo utilizados isoladamente ou em associação. Todos os fármacos conhecidos contra a leishmaniose podem conduzir a uma remissão permanente ou temporária dos sinais clínicos (OLIVA et al., 2010).

O antimoniato de meglumine é o fármaco de escolha para o tratamento da LVC na Europa (NOLI ; AUXILIA, 2005). O uso do antimonial em cães já tem sido demonstrado por pesquisas que poderia ser utilizado como medida de

controle da doença canina, uma vez que preveniu o desenvolvimento da doença em 90% dos cães assintomáticos (MARCIANTI, et.al. 1988) ou a eliminação total dos parasitos da pele (JOÃO et.al. 2006). Por outro lado, em períodos reduzidos, os cães se mantiveram não infectantes para os flebotomíneos pelo menos quatro meses após tratamento (ALVAR, et.al. 1994).

O Alopurinol é um análogo da hipoxantina e é administrado oralmente, sendo hidrolisado pelo parasita numa molécula idêntica à inosina. É incorporado no lugar do ATP durante a síntese do ácido ribonucleico (RNA) de *Leishmania*, interrompendo a síntese protéica normal (NOLI; AUXILIA, 2005; RIBEIRO, 2007). Devido a esse mecanismo de atuação, possui uma atividade leishmaniostática, baixa toxicidade (RIBEIRO, 2007; MANNA et al., 2009), além de possuir de baixo custo e a possibilidade de administração oral (BANETH, 2002; BARR, 2005; IKEDA-GARCIA, 2010).

Quando administrado isoladamente num período mínimo 60 dias induz gradativamente a remissão dos sinais clínicos, e diminuição do nível de anticorpos específicos circulantes. (KOUTINNAS et.al. 2001; VERCAMMEN et.al. 2002; IKEDA-GARCIA, 2010).

A utilização do Antimoniato de meglumina associado ao alopurinol aumenta à eficácia do tratamento, assim como, a diminuição das taxas de recorrências (NOLI, 1999) e apresentaram xenodiagnóstico negativo em 85% destes animais. (MIRÓ, 2005).

A domperidona, um antagonista dos receptores de dopamina, provoca a liberação de serotonina, que por sua vez estimula a produção de prolactina (GÓMEZ-OCHOA et al., 2009; OLIVA et al., 2010), e produção de linfócitos Ta1 e de IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α , levando à ativação dos macrófagos seguida da diminuição da população de Ta2. A administração de domperidona em cães saudáveis na dose de 0,5 mg/kg/dia durante 30 dias aumentou o grau e a duração da atividade fagocítica até 30 dias após o final da administração do fármaco (GÓMEZ-OCHOA et al., 2012). Segundo Gómez-Ochoa et al. (2009) a domperidona pode ser integrada como fármaco imunomodulador em protocolos de eficácia provada tal como o antimoniato de meglumina/alopurinol.

O tratamento diário com alopurinol e domperidona induziu a uma queda da infectividade do agente etiológico nos cães tratados, sendo essa uma

medida possível de ser aplicada em áreas de transmissão (IKEDA-GARCIA, 2010). Já que Domperidona possui um mecanismo de ativar os linfócitos T que secundariamente ativam os macrófagos melhorando a resposta imune celular (RIBEIRO, 2007; GÓMEZ-OCHOA, et.al. 2007, GÓMEZ-OCHOA, et.al. 2009).

A utilização de imunomoduladores associada a outros fármacos tem sido sugerida, entretanto pouco utilizado no tratamento da LVC (NOLI, 1999; ALVAR et al., 2004). Estes fármacos têm atuação tanto no eixo celular como humoral, diminuindo a formação de complexos antígenos-anticorpos, além da ativação de macrófagos (ALVAR et al., 2004).

A vacina contra a LVC associada ou não a outros fármacos tem mostrado o mesmo índice de cura em relação ao tratamento padrão, reduzindo o volume de fármacos e conseqüentemente reduzindo os efeitos colaterais (MAYRINK et. al., 2006).

A vacina é administrada num total de três doses com intervalos de vinte e um dias e induz uma resposta imunitária celular caracterizada por atividade de linfócitos Th1 no período de três semanas após a primeira dose, que conseqüentemente reduz a carga parasitária de *L. (L.) infantum chagasi* nos macrófagos conforme demonstrado *in vitro* (MORENO et. al., 2012).

A escolha do protocolo de tratamento será baseado com as condições do estado geral do paciente, levando em sempre em consideração que para a determinação do seu estado clínico se fazem necessários, além da avaliação através de exames laboratoriais que possam avaliar a função renal, a função hepática, as proteínas séricas, além da sorologia específica para Leishmaniose Visceral confirmadas pelo diagnóstico parasitológico (JOÃO et al., 2006; MIRÓ et al., 2005; RIBEIRO, 2006; IKEDA-GARCIA, 2010).

3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE-PIRES, G.; BRITO, M. T. de.; ALGUERÓ, C.; MARTINS, C.; RODRIGUES, O. R.; FONSECA, I. P.; SANTOS-GOMES, G. Canine Leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 137, n. 3-4, p. 275-283, 2010.

ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUZA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127 (3-4), p. 227-232, 2005.

ALVAR, J.; CRUZ, I.; MORALES, M. A.; CAÑAVATE, C. Molecular biology tools in leishmaniasis diagnosis and epidemiology. In: canine leishmaniasis: moving towards a solution. **Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum**. Sevilha: [s.n.], p. 25-30, 2002.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advance Parasitology**, v. 57, p. 1-87, 2004.

ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. Leishmaniose Visceral Canina: **Manual Schering-Plough**, p. 14, 2005.

ALVES, W. Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas. Rio de Janeiro: **Organización Panamericana de salud**. p.94-98, 2006.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÍGUEZ F.; TESOURO M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **Europa Journal Epidemiology**, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.

ASHFORD, D.; BADARO R.; EULALIO C.; FREIRE M.; MIRANDA C.; ZALIS MG.; DAVID JR. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 48, n.1, p. 1-8, 1993.

ASSIS, T.S.M.; BRAGA, A.S.C.; PEDRAS, M.J.; BARRAL, A.M.; SIQUEIRA, I.C., COSTA, C.H.N.et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.17, n.2, abr-jun. 2008.

ATHANASIOU, L. V.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KONTOS, V. I. SPANAKOS, G.; RALLIS, T. S. Treatment of canine leishmaniasis with

aminosidine at an optimized dosage regimen: A pilot open clinical trial. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, n. 1-3, p. 91-97, 2013.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; R.C.V.S.; NUNES, C.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; NORONHA JUNIOR, A.C.F; NEVES, M.F.; MACHADO, R.Z.; BUZETTI, W.A.S. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 19, n. 1, p. 17-25, jan.-mar. 2010.

BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA, A JR; JERÔNIMO, S, CARVALHO, E.M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v.12, p.1228-1231, 2000.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International journal for parasitology**, Oxford, v. 28, n. 1, January, p. 121–134, 1998.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3a ed. Canada: **Saunders Elsevier**, cap. 73, p. 685-698, 2006

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal** v.175, p. 14–15, 2008.

BANETH, G; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p.315-314, 2002.

BELO, V. S.; STRUCHINER, C. J.; WERNECK, G. L.; BARBOSA, D. S.; OLIVEIRA, R. B.; NETO, R. G.; SILVA, E. S. da. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 195, n. 1-2, p. 1-13, 2013.

BICALHO, A. P.C. Prevenção de Controle da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, Ano XII, n.70, p.26, 2007.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Veterinary News**, ano 10, n61, p. 04-05, 2003.

BONFANTI, U.; ZATELLI, A. Evaluation of proteinuria in leishmaniotic patient. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS, 1., 2004, N-poles. Abstract book of the International congress on canine leishmaniasis, N-poles: [s.n.], 2004. p. 13-18, 2004.

BLAVIER, A. KEROACK S, DENEROLLE P, GOY-THOLLOT I, CHABANNE L, CADORÉ JL, BOURDOISEAU G.. Atypical forms of canine leishmaniasis. **The veterinary journal**, v.162, p. 108-120, 2001.

BRASIL, **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Brasília da Saúde: Ministério da Saúde, 2004.

BRACHELENTE, C.; MULLER, N.; DOHERR, M. G.; SATTLER, U.; WELLE, M. Cutaneous Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs is Associated with a T Helper-2-biased Immune Response. *Veterinary Pathology*, v. 42, p. 166–175 2005.

BRITO, F.L.C.; ALVES, L.C.; MAIA, F.C.L.; SANTOS, E.S.C.; LAUS, J.L.; MEUNIER, I.M.J. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n. 5, p.. 768-776, 2004.

CALABRESE, K. S; CORTADA, V.M.; DORVAL, M.E.; SOUZA LIMA, M.A.; OSHIRO, E.T.; SOUZA, C.S.; SILVA ALMEIDA, M.; CARVALHO, L.O.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; ABREU SILVA, A.L. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 253-257, 2010.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of Leishmaniasis on Public Health, **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Disease**, V.12, n.4, p.527-548 , 2006.

CARDOSO, L.; CABRAL, M. Leishmania e leishmaniose canina. **Revista Portuguesa Ciência Veterinária**, n.13, p. 121-141, 1999.

CIARLINI, P. C.; VALADARES, T.C.; IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES M.; LIMA, V.M.L F. leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o Tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 369-375, abr./jun. 2010.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary record**, v. 141, n. 21, p. 539-43, Nov 22 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-368, 2003.

COLOMBO, F.A.; ODORIZZI, R. M. F. N.; LAURENTI, M. D.; GALATI, E. A. B.; CANAVEZ, F.; CHIOCCOLA, V. L. P. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research** v.109, n.2, p. 267-274, 2011.

CORTESE, L.; ANNUNZIATELLA, M.; PALATUCCI, A. T.; RUBINO, V.; PIANTEDOSI, D.; DI LORIA, A.; RUGGIERO, G.; CIARAMELLA, P.; TERRAZZANO, G. Regulatory T cells, Cytotoxic T lymphocytes and a TH1 cytokine profile in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Research in Veterinary Science**, v.95, p. 942–949, 2013.

CORREÂ-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Revista Veterinay Science** v.81, p. 68–75, 2006.

CORTES, S.; VAZ, Y.; NEVES, R.; MAIA, C.; CARDOSO, L.; CAMPINO, L. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 189, n. 2-4, p. 189-196, 2012.

COSTA-VAL, A. P. *Tratamento da Leishmaniose Visceral canina com antimonia pentavalente encapsulado em lipossomas*. Tese (**Doutorado em Ciência Animal**) - **Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte**, 2004.

COURTENAY, O. et al.. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control Visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal Infecto Disease.**, v.186, n.9, p.1314-1320, 2002.

DANTAS-TORRES F.; BRANDÃO-FILHO S.P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical** v. 39, p. 352-356, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Vianna) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**. V.149, p.139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGO, L .; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, 2012.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v.27, p.305-318, 2004.

DOS-SANTOS, S.M. BARROUIN-MELO, Y.F. CHANG, J. OLSEN, S.P. MCDONOUGH, F. QUIMBY, W.L. DOS SANTOS, L.C. PONTES-DE-CARVALHO, G.G. Oliveira Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 98, p. 43–48, 2004.

FEITOSA, M.M. Avaliação Clínica de Animais Naturalmente infectados. In: Forum Sobre Leishmaniose Visceral Canina, **Anais**. p.8-13, 2006.

FERRER L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J. A.; DOMINGO, M. Skin lesions in canine leishmaniosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 381–388, 1988.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **International Canine Leishmaniasis Forum**, Barcelona, Spain. **Proceedings...**Barcelona, 1999. p.6-10, 1999.

FIGUEIREDO, M. M. Análise histológica, parasitológica da pele de orelha sã de cães naturalmente e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2009, 101f. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 319-327, 1997.

FONDATI, A.; FONDEVILA, D. Dermatological aspects of canine leishmaniasis: clinical and histopathological cases In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS, 1., 2004, Nápoles. Abstract book of the International congress on canine leishmaniasis, Nápoles: [s.n]p 39-41, 2004.

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

FREITAS, J.C.C.; PINHEIRO, C.S.N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 105, s.n. p. 11-20, 2010.

FREITAS, J. C. C. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical*, jan/fev, p. 24-29, 2012.

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

GONTIJO, C.M.F; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira Epidemiológica**, v.7, p.338-349, 2004.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniasis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and antivectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology** v. 181, p. 23-30, 2011.

GRIMALDI G, J.R.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PINTO, I.S.; AZEVEDO, C.T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine e Hygiene**. v. 106, p.54-59, 2012.

GRIMALDI, G.; TEVA, A.; SANTOS, C. B.; FERREIRA, A. L.; FALQUETO, A. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 6, p. 966–71, 2012.

IKEDA, F.A.; FEITOSA, M. M. Métodos de Diagnósticos de Leishmaniose Canina. **Clínica Veterinária**, 2007.

IKEDA-GARCIA, F.A.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; CIARLINI, P.C.; MORINISH, C.K.; ZANETTE, M.F.; PERRI, S.H.V.; MARCONDES, M. Clinical and Parasitological of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania)chagasi* submitted to treatment with meglumine antimonite and allopurinol. **Brazilian journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n.3. p. 218-223, 2010.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, p. 907-910, 2007.

KUHLS, K.; ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R.; FELICIANGELI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M. A.; SCHONIAN, G. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.

LANGONI, H. ;LUCHEIS, S. B.; DA SILVA, R. C. ; CASTRO, A. P. B.;PAES, A. C. American Visceral Leishmaniasis: A Case Report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v.11, n.3, p.361-372, 2005.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica. **Revista Pan-Amazônica de Saude**, v.2, p.13-32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. **Evolution, classification and geographical distribution**. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Academic Press Inc, London, p. 1-120, 1987.

LAINSON R., RANGEL E. F. (Org). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, p. 811-827, December 2005.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. da; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E.; SACUNDINO, N. F.; PIMENTA, P. F.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competente to transmit *Leishmania (Leishmania)*

infantum chagasi to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, 2013.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6 n.67, p. 13-23, 2009.

LEITE, R.S.; FERREIRA, S.A.; ITUASSU, L.T.; MELO, M.N.; ANDRADE, A.S.R. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swabs samples. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p.201-206, 2010.

LIMA, V.M.F.; FATTORI, K.R.; MICHELIN, A.F.; SILVEIRA-NETO, L.; VASCONCELOS, R.O. Comparasion between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rk39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 330-333, 2010.

LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; DUARTE, S. C.; FERNANDES, P.R.; Amaral, A. V.C.; SOUZA, M. A. Relato De Um Caso Clínico de Leishmaniose Visceral em um Cão da Cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, p. 69-72, 2005.

LIRA, R.A., CAVALCANTI, M.P., NAKAZAWA, M., FERREIRA, A.G.P., SILVA, E.D, ABATH, F.G.C., ALVES, L.C., SOUZA, W.V., GOMES, Y.M. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose visceralcanine- Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canine-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, **137**: 11-16, 2006.

LUVIZOTTO, M.C.R. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**. Manual técnico de Leishmaniose Visceral Canina, São Paulo, Brasil. Ed. Fort Dodge. 2004. 56p.

LUVISZOTTO, M.C.R; Diangóstico de Leishmaniose visceral canina. In: *__Leishmune Manual Técnico Leishmaniose Visceral*, Fort Dodge, seção 3, p. 28-29, 2005.

LUVIZOTTO, M.C.R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: 1º FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. **Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral canina**, p.15-22, 2006.

MADEIRA, M.F. et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 260-262, 2009.

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

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PICILLO, E.; PAVONE, L. M.; GRAVINO, A. E. Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine

antimoniate and allopurinol. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 2, p. 279-82, 2008.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; PICILLO, E.; NEGLIA, G.; VESCIO, F.; GRAVINO, A.E. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **Journal Veterinary**, v. 182, p.441-445, 2009..

MARCONDES, M.; BIONDO, A.W.; GOMES, A.A.; SILVA, A.R.; VIEIRA, R.F.; CAMACHO, A.A.; QUINN, J.; CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology** 175: 15-19, 2011.

MAROLI M, GRADONI L, OLIVA G, CASTAGNARO M, CROTTI A, LUBAS G, PALTRINIERI S, ROURA X, ZINI E, ZATELLI A: Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236 n.11, p.1200-1206, 2010.

MARCONDES, M.; C. N. ROSSI. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARTIN-SANCHEZ, J.; GRAMICCIA, M.; DI MUCCIO, T.; LUDOVISI, A.; MORILLAS-MÁRQUEZ F Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in Southern Spain. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98 p. 228–232, 2004.

MAURICIO I.L.; HOWARD M.K.; STOTHARD J.R.; MILES M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v.119, p. 237-246, 1999.

MAURICIO, I. L.; GAUNT, M. W.; STODARD, J. R.; MILES, M. A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, v. 122, p. 393-403, 2001.

MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil:quadro atual, desafios e perspectivas Visceral. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 7, n 338, 2004.

MICHALICK, M. S. M. Gênero leishmania. In: NEVES, D. P. (Ed.). *Parasitologia humana*. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. P.47-p. 41-p. 46.

MIKAEILI, F.; FAKHAR, M.; SARKARI, B.; MOTAZEDIAN, M.H.; HATAM, G. Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain. **Iran Journal of Immunology**. n 4, p.116-121, 2007.

MISSAWA, N. A.; MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; SANTOS DIAS, E. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral

leishmaniasis. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v.26 n.12, p. 2414-2419, dez, 2010.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; ROCHA, M.F.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E. D. Leishmaniose Visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 38, n. 2, p.147-152, Mar-abr, 2005.

MORENO, E.; MELO, M.N.; ANTUNES, C.M.F.; LAMBERTUCCI, J.R.,; SERUFO, J.C.; ANDRADE-RIBEIRO, A.S.; CARNEIRO, M. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana assintomática em área urbana, Sabará, Minas Gerais, 1998-1999. **Informe Epidemiológico do SUS**; v.11, p.37-9, 2002.

MORENO J.; ALVAR J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v.18 p. 399-405, 2002.

MORENO, J., NIETO, J., CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v. 71, n. 3/4, p. 181-195, 1999.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L.M.; GRIMALDI J.R.; G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; RANGEL JR, F.B. ; TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in RIO DE JANEIRO, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings. (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, p.349-357, 1985.

MARZOCHI, M.C.A. Curso – Doenças Infecto-Parasitárias (DIP): Aula 39 – Leishmanioses no Brasil. *In J. Bras. Med.*, v.63, p.82-104, 1992.

MARTINEZ F.O.; HELMING L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. **Annual review of immunology**, v. 27, 451-483, 2009.

MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in *the Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v.119, p. 237-246, 1999.

MORENO, J.; VOULDOUKIS, I.; MARTIN, V.; MCGAHIE, D.; CUISINIER, A.M.; GUEGUEN, S. Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases** v.6, p. 1-7, 2012.

NASCIMENTO, M. do D.S.B.; COSTA, J.M.L.; FIORI, B.I.P.; VIANA, G.M.C.; FILHO, M.S.G.; ALVIM, A.C.; BASTOS, O.C.; NAKATANI, M.S.R.; BADARÓ, R.; SILVA, A.R.; BURATTINI, M.N. Aspecto epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no estado do Maranhão - Brasil. **Revista**

da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 3, p. 219-228, maio/jun. 1996.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**. v. 9, n.2, p. 16-24, 1999.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World Visceral Leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, v.16, p.213-232, 2005.

NOLI, C ; SARIDOMICHELAKIS M. N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **The Veterinary Journal**, 2014.

OLIVA, G.; ROURA, X.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; CASTAGNARO, M.; GRADONI, L.; LUBAS, G.; PALTRINIERI, S.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.236, p.1192–1198, 2010.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, Informe final de la reunión de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral en las Américas, Vol 1, 1ª Edition. **Organización Panamericana de la salud**, Rio de Janeiro, 150 p. 2006.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, July 2013, v. 29, n.. 7

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGU, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, p. 1184–1191. 2010.

PORROZZI R1, PEREIRA MS, TEVA A, VOLPINI AC, PINTO MA, MARCHEVSKY RS, BARBOSA AA JR, GRIMALDI G JR. *Leishmania infantum*-induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a primate model for visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 100, n.10, p. 926-937, 2007.

PENNISI, M. G. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. **Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum. Sevilha**: [s.n.], 2002, p. 39-48.

PETERS, N. C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p. 970-974, 2008.

PITA-PEREIRA, D. de; CARDOSO, M. A.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia*

forattinii (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, Basel, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

QUARESMA, P.F.; MURTA, S.M.; FERREIRA, E.C.; ROCHA-LIMA, A.C.; XAVIER, A.A.; GONTIJO, C.M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and a quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v.111, p. 289-294, 2009.

QUEIROZ, N.M.G.P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; NUNES, C.M.; STARKEBUZETTI, W.A. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 19, n.1, p.34-40, 2010.

RANGEL, E.F. Flebotomos Transmissores da *Leishmania (L.) infantum chagasi* nas Américas e Técnicas Disponíveis de Captura para Vigilância Entomológica. Consulta de Expertos OPS/OMS Sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas, 1., 2005, Brasília. Informe final de La reunion de esxpertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Americas. Rio de Janeiro: **Organización Panamericana de Salud**, p.83-84, 2006

REITHINGER, R.; QUINNELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2352–2356, 2002.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.;

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.87-95, 2009.

RHALEN, A.; SAHIBI, H.; LASRI S.; JAFFE, C.L. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, n. 1, 1 October, p. 69–76, 1999.

RIBEIRO, V.M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal**, v.11, n.3, p.13-19, 2001.

RIBEIRO, V.M. et al.; Leishmaniose Visceral Canina. Manual Técnico. **Ed. Fort Dodge**, São Paulo. Brasil, p. 56, 2004.

RODRÍGUEZ-CORTÉS A.; OJEDA A.; FRANCINO O.; LÓPEZ-FUERTES L.; TIMÓN M.; ALBEROLA J. *Leishmania* Infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a “Gold Standard”. **Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.8, n.2, p.251-256, 2010.

ROZE, M. Canine Leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. **European Journal of Companion Animal Practice**, v,15, o. 39-52, 2005

SARIDOMICHELAKIS, M.N., MYLONAKIS, M.E., LEONTIDES, L.S., KOUTINAS, A.F., BILLINIS, C., KONTOS, V.I., Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* v.73, p.82–86, 2005.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, v.20, p.471-489. , 2009.

SILVA, S. M.; AMORIM, I. F. G.; RIBEIRO, R.R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELI, C.; M. N. M.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N.F.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARDC, F. Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. **American Society for Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 2858–2867 June 2012.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **Journal Clinical Microbiology**, v.39, p.560-563, 2001.

SOLCÀ, M.D.S., GUEDES, C.E.S., NASCIMENTO, E.G., OLIVEIRA, G.G.D.S., DOSSANTOS, W.L.C., FRAGA, D.B.M., VERAS, P.S.T.,. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**. v.184, p. 133–140, 2012.

SONODA, M. C. Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 á 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2007. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SUNDAR S, PAI K, SAHU M. Immunochromatographic strip test detection of anti K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. **Annals Tropical Medical Parasitology**, 96: 19-23, 2002.

TAVARES, C. A.; FERNANDES, A P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert review of molecular diagnostics**, v 3, n. 5, p. 657-667, setembro 2003.

TORRES-NETO, R. et al. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 667-676, 2008.

TRIGO, J.; ABBEHUSEN, M. NETTO, E. M.; NAKATANI, M.; PEDRAL-SAMPAIO, G.; JESUS, R. S.; GOTO, Y.; GUDERIAN, J.; HOWARD, R. F.; REED, S. G. Treatment of visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. **Vaccine**. 2010.

VERCAMMEN, F.; FERNANDEZ-PEREZ, F. J.; DEL AMO, C.; ALUNDA, J. M. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. **Acta Tropica**, v. 84, p.175-181, 2002.

VERÇOSA, B. L. A.; LEMOS C.M.; MENDONÇA I.L.; SILVA S.M.; CARVALHO S.M.; GOTO H.; COSTA F. A. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 4, n. 45, 2008.

VIDAL, I. F. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina em Campina Grande, Paraíba, Brasil. **Dissertação de Mestrado (Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE**.

VIEIRA NETO, F.A.; SOUSA, A.K.S.; MARQUES, M.V.; ARRUDA, D.S.; SILVA, L.A. Avaliação de parâmetros bioquímicos em cães infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista de Ciências Saúde**, São Luís, v.13, n.2, p. 131-140, jul-dez, 2011.

VINHAS, V.; ANDRADE, B.B.; PAES, F.; BOMURA, A.; CLARENCIO, J. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. **European Journal Immunology**, v. 37, p. 3111–3121, 2007.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Programme for the surveillance and control of leishmaniasis**. 2003.

WHO 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. In WHO Technical Report Series, Organization, W.H., ed. (Genebra, World Health Organization), p. 201.

XIMENES, M.F.F.M.; SILVA, V.P.M.; QUEIROZ, V.S.; REGO, M.M.; CORTEZ, A.M.; BATISTA, L.M.M.; MEDEIROS, A.S.; JERONIMO, S.M.B. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) e leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil – reflexos do ambiente antrópico. **Neotropical Entomology**, v.36, n.1, p. 128-137, 2007.

4 – OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar a carga parasitária em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submetidos a tratamento experimental.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliação clínica dos animais naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submetidos a tratamento experimental;
- Avaliar o parasitismo cutâneo de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* através da técnica da imunohistoquímica submetidos ao tratamento experimental;
- Monitorar através da Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) os animais com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submetidos ao tratamento com alopurinol, domperidona e vacina.

ARTIGO 1

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE CÃES (*Canis familiaris*)
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) infantum*
chagasi SUBMETIDOS A TRATAMENTO EXPERIMENTAL**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*
SUBMETIDOS A TRATAMENTO EXPERIMENTAL**

Clinical and laboratorial evaluation of naturally infected dogs with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submitted to experimental treatment

RESUMO: A leishmaniose visceral é zoonose, causada pelo protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. O cão doméstico é considerado o mais importante reservatório do parasita. A obtenção de conhecimentos detalhados dos parâmetros clínicos e laboratoriais são fundamentais para o monitoramento de pacientes em tratamento. O objetivo deste trabalho foi a avaliação clínica e laboratorial cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi* submetidos a protocolo de tratamento. Utilizou-se sangue total e soro de 18 cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, coletados antes e após tratamento. Foram analisados os valores do eritrograma, leucograma, plaquetas e quantificadas as concentrações séricas de Fosfatase Alcalina, Alanina Aminotransferase, Ureia e Creatinina. Todos os animais apresentaram pelo menos um sinal clínico sugestivo para leishmaniose visceral no momento zero. Os achados mais frequentes nos exames laboratoriais foram: anemia normocítica normocrômica 39% (7/18), trombocitopenia 50% (9/18) e leucopenia em 17% (3/ 18) dos cães. Não foi encontrado alterações nos valores da função renal e nem hepática no momento zero. Após seis e doze meses de tratamento, houve melhora clínica e normalização nas taxas do hemograma, e a função orgânica do fígado e dos rins permaneceu inalteradas. Pode-se concluir que o tratamento com alopurinol, domperidona e vacina promoveu remissão dos sinais clínicos em todos os animais e que os valores hematimétricos e bioquímicos podem ser utilizados para o prognóstico e acompanhamento de animais submetidos a tratamento para Leishmaniose visceral.

PALAVRAS-CHAVES: Leishmaniose - quadro clínico - hemograma

Abstract - Visceral leishmaniasis is a zoonosis caused by species of protozoan *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. The domestic dog is considered the most important parasite reservoir. Obtaining detailed knowledge of the clinical and laboratory parameters are central for monitoring patients in treatment. This study aimed to evaluate clinical and laboratorial dogs naturally infected with *Leishmania (L.) infantum chagasi* submitted to treatment protocol. Blood and serum samples were used from 18 dogs naturally infected with *Leishmania (L.) infantum chagasi*, collected before and after treatment. The values of erythrocyte, white blood cell count, platelet were analyzed and serum concentrations of alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, Urea and Creatinin were measured. All animals showed at least one clinical sign suggestive of visceral leishmaniasis at the time zero. The most common findings in laboratory tests were normochromic normocytic anemia 39% (7/18), thrombocytopenia 50% (9/18) and leukopenia in 17% (3/18) of dogs. No changes were found in the values of hepatic or renal function at time zero. After six and twelve months of treatment, there was clinical improvement and normalization in blood count rates, but the organic function of the liver and the kidneys remained unchanged. It can be concluded that treatment with allopurinol, domperidone vaccine and remission of clinical signs in all animals and the hematimetric and biochemical values can be used for prognosis and monitoring of animals in treatment for visceral leishmaniasis.

KEYWORDS: Leishmaniasis- clinical picture- blood count

1 – INTRODUÇÃO

No Brasil a espécie de protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* é a responsável pela infecção da Leishmaniose Visceral em mamíferos (IKEDA-GARCIA et al., 2010), principalmente no homem e em caninos domésticos (MAIA et.al., 2010).

A infecção canina pode produzir uma variedade de sinais clínicos, que dependem da resposta imune do hospedeiro, quer seja pelo parasitismo da *Leishmania* sp nas células do sistema fagocítico mononuclear, bem como pela deposição de imunocomplexos em vários órgãos (ALVAR et al., 2004).

Sendo assim, os cães podem apresentar-se infectados por *L. (L.) infantum chagasi*, sem, entretanto exibir sinais clínicos por um longo período, desta forma participando na cadeia epidemiológica de transmissão como fonte de infecção (MORENO; ALVAR, 2002; CASTRO et al., 2012) ou podem evoluir para a forma clínica podendo culminar com a morte do animal (MANCIANTI et al., 1988).

Entre os sinais clínicos, mais frequentes destacam-se as oftalmopatias, dermatopatias, onicogribose, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (GÓMEZ-OCHOA et. al., 2007; PALTRINIERI et.al., 2010; CASTRO et al., 2012; LAURENTI et al., 2013). Embora não estejam necessariamente presentes em todos os animais (REIS et al., 2006), alguns achados clínicos laboratoriais podem ser encontrados como a anemia, trombocitopenia, e alterações nas funções renal e hepática (ALMEIDA et al., 2005).

Por outro lado, o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) representa um desafio para o médico veterinário, devido à extrema complexidade de sua patogenia que se expressa pela variedade nos sinais clínicos. Desta forma o tratamento da LVC tem sido descrito na tentativa da remissão dos sinais clínicos e redução na capacidade infectante dos animais (CIARLINI et al., 2010; TRIGO et al., 2010).

Neste contexto considerando a variedade de fármacos utilizados, a condição clínica do paciente, o protocolo terapêutico, a cura ou remissão dos sinais clínicos continua sendo um problema para medicina veterinária.

Sendo assim, em função da ausência de trabalhos versando sobre o monitoramento de animais submetidos ao tratamento no nordeste brasileiro,

área com grande incidência da LVC, o objetivo deste trabalho foi à avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submetidos a tratamento experimental.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 18 cães domiciliados, de ambos os sexos, de raça e idade variadas, provenientes da Região Metropolitana do Recife, atendidos no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário (HV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, registrado sob o protocolo de número 077/2014.

Todos os animais apresentavam quadro clínico sugestivo de LVC e apresentavam-se sororreagentes a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ao teste Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e confirmados pelos testes parasitológicos (biópsia de medula óssea, aspirado de linfonodos e citologia esfoliativa) pesquisa das formas amastigotas da *L. (L.) infantum chagasi*.

Avaliação Clínica

Os animais foram avaliados do ponto de vista clínico, seguindo as normas semiológicas observando as alterações orgânicas sugestivas de LVC (FERRER, 1999). Foram considerados aptos ao tratamento aqueles animais que mostraram boa condição corporal e ausência de patologias associadas.

Após o processo de triagem, os animais foram mantidos domiciliados, e permaneceram durante todo o período experimental com uma coleira parasiticida a base de deltametrina, substituída a cada quatro meses, bem como aplicação mensalmente permetrina “pour-on”.

Protocolo de Tratamento

Os animais foram submetidos ao protocolo de tratamento para LVC com Alopurinol na dose de 10 mg/kg a cada 12 horas e domperidona 1 mg/kg a cada 24 horas, por via oral, durante todo o período do experimento, associado

a aplicação de três doses da vacina inativada e de subunidade, sendo uma fração glicoprotéica purificada, com intervalo de 21 dias, por via subcutânea, na diluição de duas partes do liofilizado para uma do diluente, sendo realizadas avaliações clínicas e laboratorial nos momentos zero (M0), seis meses (M6) e doze meses (12M).

Análises Hematimétricas e bioquímicas

As amostras de sangue foram coletas nos tempos: momento zero (M0), e após o tratamento, seis meses (M6) e doze meses (12M), por meio de punção da veia cefálica, para as determinações hematimétricas e o soro para realização dos testes bioquímicos. Os parâmetros avaliados no hemograma nos animais submetidos ao tratamento foram: o eritrograma, o leucograma e a contagem total de plaquetas obtidos através de um contador automático da marca Rocher® (modelo POCH 100 IV) e a concentração da ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) foram realizados por meio de metodologia cinética, através dos kits comerciais Labtest Diagnostica® e realizado de acordo com o fabricante.

Análise Estatística

As análises dos dados clínicos utilizou-se o teste Q de Cochran, para a avaliação da evolução do peso dos animais e valores hematimétricos (eritrograma, leucograma e plaquetas) e bioquímica sérica (ALT, FA, Uréia e Creatinina) utilizou-se o teste paramétrico ANOVA de um fator.

O programa estatístico utilizado para os dados obtidos foi o Software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise dos Dados Clínicos

Dos animais que iniciaram o tratamento, 100% (18/18) apresentavam sinais clínicos sugestivos da LVC, linfadenopatia, hepatoespleniomegalia, oftalpatias, dermatopatias, onicogrifoses. Os achados clínicos obtidos assemelham-se aos reportados por outros autores na avaliação clínica pré-tratamento (FERRER, 2002; COSTA VAL, 2004; ALMEIDA et al., 2005; AGUIAR, et al., 2007; CASTRO, et.al., 2012; FREITAS, et.al., 2012; ATHANASIOU, et al, 2013).

O quadro clínico nos cães portadores de LV tem sido descrito como bastante variado, devido à influência da própria resposta imune em controlar a replicação do parasita (SILVA, 2007; ALMEIDA, et.al., 2010; ALEXANDRE PIRES, et.al., 2010; IKEDA-GARCIA, et. al. 2010; CASTRO, et.al., 2012).

Os sinais clínicos mais freqüentes observados no momento zero (M0) foram à dermatopatias 89% (16/18), sendo a dermatite descamativa a mais frequente 83% (14/18) seguido da dermatite ulcerativa 61% (11/18) e onicogrifose 61% (11/18). Estudos realizados por Aguiar, et al. (2007) e Freitas, (2012), sobre o quadro clínico, as dermatopatias estavam presentes 100% dos cães.

Também no M0 a linfadenomegalia foi observada em 72% dos animais (13/18). Este dado se aproxima aos de Silva, et al (2012) e Athanasiou, et al (2013) onde relataram em seus estudos no momento zero, a linfadenomegalia estava presente em 75% e 100% dos cães respectivamente. A proliferação de macrófagos e do parasita nos órgãos linfoides é o principal responsável pela linfadenomegalia, comum em pacientes com LVC, podendo em alguns casos ser generalizada (NOGUEIRA, 2007; MARCELLO, 2009).

As lesões oftálmicas foram encontradas em 56% (10/18) dos cães. Também descritas por Paltrinieri et al. (2010) e Marcondes; Rossi (2013) como sinais comuns encontrados em animais infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Estas alterações parecem estar associadas à deposição de imunocomplexos, tanto circulantes, que se depositam sobre as células

endoteliais, e presença inflamações granulomatosas ou difusas associadas à presença do parasito (SAUQUILLO, 2005).

O emagrecimento foi observado em 28% (5/18) dos animais, semelhante ao descrito Baneth, et al. (2006) em 22%, sugerindo que esses animais encontravam-se em uma fase mais avançada da doença.

A atrofia da musculatura esteve presente em 22% (4/18) nas regiões da cabeça (fossa temporal e músculos mastigatórios). Ferraro et al. (2012), apontaram que a presença do parasita desencadeia eventos inflamatórios e necróticos na fibra muscular, e que são responsáveis pela perda da musculatura, e não só apenas decorrente de catabolismo e perda progressiva e de peso.

Houve remissão significativa e progressiva dos sinais clínicos entre os M6 e M12 em relação M0: dermatite descamativa ($p < 0,01$), dermatite ulcerativa ($p < 0,0001$), onicogribose ($p < 0,01$), linfadenopatia ($p < 0,05$), oftalmopatia ($p < 0,001$), emagrecimento ($p < 0,001$), atrofia muscular ($p > 0,05$) e mucosas hipocoradas ($p < 0,05$).

A melhora clínica verificada durante o tratamento já tem sido relatada em pesquisas realizadas com diferentes protocolos por Nogueira, (2007) que evidenciou melhora em 75% dos animais tratados com anfotericina b; Ikeda-Garcia et al. (2011) obteve 100% a remissão dos sinais clínicos utilizando antimoniato de meglumine e alopurinol; e GOMÉZ-OCHOA et al. (2007) com 86% de melhora clínica em animais tratados com domperidona.

A administração do Alopurinol em associações com outros fármacos por longo prazo tem demonstrado uma boa opção, devido sua baixa toxicidade e significativa diminuição na taxa de recaídas devido a sua atuação leishmaniostático (NOLI; AUXILIA, 2005; SILVA 2007).

Embora tenha ocorrido à melhora clínica e ganho de peso em 100% (18/18) dos animais, alguns sintomas persistiram no M12: linfadenopatia 33% (6/18), onicogribose e oftalmopatia 11% (2/18). Ao término do período de avaliação, 67% (12/18) dos cães tornaram-se assintomáticos e 33% (6/18) permaneceram sintomáticos. Por ser uma doença caracterizada pelo comprometimento de células do sistema macrofagocitário, a presença de parasitos em órgãos linfóides, em especial nos linfonodos, ou alterações da celularidade, são esperados em animais infectados (BOGDAN et al. 2000).

TABELA 1 – Frequência dos sinais clínicos dos cães pré e pós-tratamento.

Sinais Clínicos	M0	M6	M12
Linfadenomegalia	72% (13/18)	72% (13/18)	33% (6/18)
Atrofia de Musculatura	22% (4/18)	AUSENTE	AUSENTE
Mucosas hipocoradas	28% (5/18)	AUSENTE	AUSENTE
Lesões Oftálmicas	56% (10/18)	56% (10/18)	11% (2/18)
Emagrecimento	28% (5/18)	AUSENTE	AUSENTE
Dermatite descamativa	83% (14/18)	AUSENTE	AUSENTE
Dermatite ulcerativa	61% (11/18)	AUSENTE	AUSENTE
Onicogribose	61% (11/18)	61% (11/18)	11% (2/18)

Momento zero (M0), Seis meses de tratamento (M6) e Doze meses de tratamento (M12).

Análise Hematimétrica

No M0, o eritograma dos animais demonstrou que 39% (7/18) apresentaram anemia do tipo normocítica normocrômica e 50% (9/18) apresentaram também número de plaquetas abaixo dos valores de referência.

A ocorrência de anemia é bastante comum na LVC, podendo ser relacionada à perda sangue ou lise das hemácias e diminuição na produção de eritrócitos, decorrente de hipoplasia ou aplasia medular ocasionada por mecanismos imunomediados em resposta a infecção pelo parasita, induzindo a presença de infiltrado linfocitário, plasma e macrófagos (FEITOSA et al., 2000; IKEDA et al., 2008; COSTA-VAL, et al., 2007; TEMÍZEI et al., 2011;).

A leucopenia ocorreu em 17% (3/ 18) dos cães. Essa alteração tem sido descrita como um achado clínico comum, podendo variar para leucocitose em animais com LVC, e que pode está relacionando a outras patologias associadas (SHAW, 2009; CIARLINI, et al., 2010; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Os valores médios para as contagens totais dos leucócitos parecem não ter interferências significativas com o tratamento ou com a evolução da doença. O infiltrado inflamatório e o parasitismo medular parecem não influenciar negativamente as células precursoras dos leucócitos e plaquetas, como se supõe que ocorra com as hemácias (COSTA VAL, 2004; SILVA, et.al., 2011).

Os valores do eritrograma, leucograma e plaquetas entre os momentos M6 e M12 foram maiores que os valores no M0, ao nível de confiança de 5% ($p < 0,001$; teste ANOVA), porém não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,0001$) entre os momentos avaliados. Entretanto o aumento dos valores do eritrograma, leucograma e plaquetas pós-tratamento provavelmente estão associados á uma menor carga parasitária do animal quando comparada ao momento zero.

Com a evolução dos parâmetros hematimétricos nos momentos pós-tratamento houve desaparecimento do quadro anêmico entre os M6 e M12. Ikeda-Garcia et al (2008) utilizando o protocolo de tratamento com antimoniato de meglumine em sete cães, todos os animais anêmicos apresentaram uma resposta eritrocítico regenerativa, evidenciado por um aumento no número de células progenitoras eritróides na medula óssea, e pela presença de rubricitos e metarrubricitos no sangue periférico.

Essa melhora clínica também é reportada em estudos com outros fármacos anti-Leishmania, como anfotericina B, aminosidina, antimoniato de meglumine e alopurinol (NOGUEIRA, 2007; IKEDA-GARCIA, et al., 2008; CIARLINI, et al., 2010; SILVA, et al. 2011; ATHANASIOU, 2014; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Tabela 2: Comparação entre os resultados obtidos no hemograma pré e pós-tratamento de cães com LV.

VARIÁVEL	M0	M6	M12
Eritrograma* (x 10 ⁶ /dl)	5,30 ± 1,57a	8,66 ± 8,89a	11,29 ± 4,78a
Leucograma** (x 10 ³ /dl)	9,30 ± 3,71a	8,66 ± 8,89a	11,29 ± 4,78a
Plaquetas*** (x 10 ³ /dl)	209,59 ± 120,57b	242,46 ± 109,12b	255,52 ± 112,44b

Valores de referência: * 5,5 a 8,5 x 10⁶/dl ** 6,0 a 17,0 x 10³/dl *** 200 a 500 x 10³/dl (GARCIA-NAVARRO, 2005)

Letras minúsculas na mesma linha em diferentes momentos não houve diferença significativa

Análise Bioquímica

Os valores médios e desvio padrão das variáveis uréia, creatinina, ALT e FA estão expresso na (tabela 3). No M0 100% (18/18) dos animais apresentaram valores considerados normais segundo KANEKO et al., (1997), utilizados como critério de inclusão para o presente estudo.

Nos M6 e M12 todos os animais permaneceram sem alterações. As concentrações séricas de ALT, FA, ureia e creatinina não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre os momentos M0, M6 e M12. No entanto os parâmetros bioquímicos são úteis para avaliar, sobretudo a função renal e hepática ao mesmo tempo em que nos permite obter informações acerca do desenvolvimento da resposta imunitária, bem como acompanhamento das funções orgânicas de animais em tratamento para LV (MOREIRA, 2010; VIEIRA NETO, et al., 2011)

Tabela 3: Comparação dos resultados obtidos da bioquímica sérica de cada momento de cães com LV submetidos a protocolo de tratamento experimental.

VARIÁVEL	M0	M6	M12
Alanina Aminotransferase	29,96 ± 15,83 ^a	37,67 ± 27,85 ^a	29,42 ± 7,71 ^a
Fosfatase Alcalina	93,52 ± 139,94 ^b	65,69 ± 40,93 ^b	57,85 ± 34,97 ^b
Ureia	38,68 ± 12,03 ^{ab}	35,91 ± 10,81 ^{ab}	37,17 ± 22,26 ^{ab}
Creatinina	0,88 ± 0,19 ^{ab}	0,99 ± 0,27 ^b	0,91 ± 0,24 ^b

4 - CONCLUSÃO

Após a administração do tratamento utilizando associações de alopurinol, domperidona e vacina, pode-se observar que houve a remissão dos sinais clínicos em todos os animais. E que os valores hematimétricos e bioquímicos podem ser utilizados para o prognóstico e acompanhamento de animais submetidos a tratamento para Leishmaniose visceral.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE-PIRES G.; BRITO, M. T. V.; ALGUERÓ, C.; MARTINS, C.; RODRIGUES, O. R.; FONSECA, I. P.; SANTOS-GOMES, G. Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.137, p.275–283, 2010.

AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D. V. V.; COSTA, R.L. G.; JULIÃO, F.S.; SANTOS, Washington L. C.; BARROUIN MELO, S. M. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania*

chagasi em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p. 283-294, out/dez, 2007

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÍGUEZ, F.; TESOURO, M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **Europe Journal Epidemiology**, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.

ATHANASIOU, L. V.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KONTOS, V. I. SPANAKOS, G.; RALLIS, T. S. Treatment of canine leishmaniasis with aminosidine at an optimized dosage regimen: A pilot open clinical trial. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, n. 1-3, p. 91-97, 2013.

ASHFORD, D. A.; BADARO, R.; EULALIO, C.; FREIRE, M.; MIRANDA, C.; ZALIS, M.G.; DAVID, J.R. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 48, n.1, p. 1-8, 1993.

BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G., BASTOS; F.I., XIMENES, R.A.; BARATA, R.B.; RODRIGUES, L.C. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **The Lancet**, v. 377, p. 1877–1889, 2011.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Veterinary Journal*, v.175, p. 5 -14, 2008.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3a ed. Canada: **Saunders Elsevier**, v. 73, p. 685-698, 2006

BOGDAN, C. et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **The Journal of experimental medicine**. v.191, n.12, p. 2121-2130, 2000.

CASTRO, I. P.; SOUSA, M. V. C.; MAGALHÃES, G. M.; MUNDIM, A. V.; NOLETO, P.G.; PAULA. M. B. C.; PAJUABA NETO, A. A.; MEDEIROS, A. A. Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral. **Bioscience Journal**, n. 5, v. 28, p. 799-804, 2012.

CIARLINI, P. C.; VALADARES, T.C.; IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES M.; LIMA, V.M.L F. leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o Tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 369-375, abr./jun. 2010.

COSTA-VAL, A. P. *Tratamento da Leishmaniose Visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas*. Tese (**Doutorado em Ciência Animal**) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

COSTA-VAL, A.P. et al., Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia*

(*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, n. 174, p. 636–643, 2007.

COSTA-VAL A.P.; CAVALCANTI R.R.; GONTIJO, D. F. N.; MICHALICK, M.S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS P.; MELO M.N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**. 174: 636-643, 2007.

FERRER L. Canine Leishmaniosis: evaluation of the immunocompromised patient. In: **WSAVA Congress Choose**, 8, Granada. Proceedings; p.78-95, 2002.

FREITAS, J. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C.; LOPES NETO, B. E.; SANTOS, G. J.; ABREU, C. R.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.

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

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E.; SACUNDINO, N. F.; PIMENTA, P. F.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, 2013.

MAIA, C.; GOMES, J.; CRISTÓVÃO, J.; NUNES, M.; MARTINS, A.; REBÊLO, E.; CAMPINO, L. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.336-340, 2010.

MARCELLO, G. C. G. Hemograma, proteinograma e determinação das atividades séricas da haptoglobulina e da ceruloplasmina em cães (*Canis familiaris*) sorreatores para *Leishmania* sp da região metropolitana do Rio de Janeiro-RJ. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária- Clínica e Reprodução animal). Universidade Federal Fluminense. 2009.

MARCONDES, M.; C. N. ROSSI. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MIRÓ, G. C. La Leishmaniosis canina. 2ª Parte. Manejo clínico da la leishmaniosis canina: ¿ Podemos unificar critérios?. *Inf. Veterinary Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España*, setembro, p. 44-49, 2005.

NOLI, C ; SARIDOMICHELAKIS M. N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **The Veterinary Journal**, 2014.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal American Veterinary Medical Association**. V. 236, p.1184–1191, 2010.

IKEDA-GARCIA, F.A.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; CIARLINI, P.C.; MORINISH, C.K.; ZANETTE, M.F.; PERRI, S.H.V.; MARCONDES, M. Clinical and Parasitological of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimonite and allopurinol. **Brazilian journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n.3. p. 218-223, 2010.

REIS, A.B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are Associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research Veterinary Science**, v.81, p.68-75, 2006.

SAUQUILLO, M. C. T. La Leishmaniosis canina. 2ª Parte. Manifestaciones oculares em La leishmaniosis canina. *Inf. Vet. Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España*, setembro, p. 39-43, 2005.

SHAW, S.E.; LANGTON, D.A.; HILLMAN, T.J. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: A zoonotic disease waiting for a vector? **Veterinary Parasitology**, v. 163, 281–285, 2009.

SILVA, S. M.. Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937), submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de Belo Horizonte. 2007. 133 f. **Dissertação (Mestrado em parasitologia do Instituto de ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais 2007.**

SILVA, S. M.; AMORIM, I. F. G.; RIBEIRO, R.R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELI, C.; M. N. M.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N.F.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARDC, F. Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. **American Society for Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 2858–2867 June 2012.

SILVA, A.D. F.; SOUZA LIMA, M. C. J.; SOTO-BLANCO, B. Perfil hematológico e eletroforético de proteínas séricas em cães soropositivos para leishmaniose visceral no estado do rio grande do norte. **Acta Veterinaria Brasilica**, n.3 v.5, p.300-305, 2011.

TRIGO, J.; ABBEHUSEN, M. NETTO, E. M.; NAKATANI, M.; PEDRAL-SAMPAIO, G.; JESUS, R. S.; GOTO, Y.; GUDERIAN, J.; HOWARD, R. F.; REED, S. G. Treatment of visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. **Vaccine** 2010.

VIEIRA NETO, A.F.; SOUSA, A.K.S.; MARQUES, M. V.; ARRUDA, D. S.; SILVA, L. A. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CÃES INFECTADOS POR *Leishmania chagasi*. **Revista Ciência da Saúde**. v.13, n. 2, p. 131-140, jul-dez, 2011.

ARTIGO 2

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA NA PELE DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) infantum*
chagasi SUBMETIDOS A TRATAMENTO EXPERIMENTAL**

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA NA PELE DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) infantum*
chagasi SUBMETIDOS A TRATAMENTO EXPERIMENTAL**

Evaluation of Parasite Density in naturally infected dogs skin with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submitted to experimental treatment

RESUMO A Leishmaniose Visceral Canina é uma doença que tem como agente etiológico no Brasil a espécie do protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, endêmica em várias regiões, transmitida pelo inseto-vetor *Lutzomyia longipalpis*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a densidade parasitária da pele de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submetidos a tratamento experimental. Foram utilizados 18 amostras de pele de cães com leishmaniose submetidos a protocolo de tratamento experimental, avaliados antes (M0) e após tratamento (M6 e M12). Para identificação e quantificação de formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi aplicada à técnica de imuno-histoquímica (IHQ). No momento zero, 66,7% (12/18) dos cães apresentaram imunomarcagem com 40% (7/18) e 28% (5/18) desses animais apresentando alta e baixa densidades parasitária respectivamente. Após seis meses de tratamento (M6), apenas 16,7% (3/18) permaneceram positivos na IHQ e após doze meses (M12) não foram encontradas formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* na pele de nenhum dos animais. Os resultados aqui obtidos pode-se concluir que a associação de fármacos utilizada foi efetivo na redução dos sinais clínicos e no completo desaparecimento das formas amastigotas na pele dos animais com infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi*.

Palavras-chaves: Cães, Imuno-histoquímica - carga parasitária

Abstract: The Canine Visceral Leishmaniasis is a disease whose etiological agent in Brazil is the species of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, endemic in several regions, transmitted by insect vector *Lutzomyia longipalpis*. This study aimed to evaluate the skin parasite density of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* undergoing experimental treatment. 18 skin samples of dogs submitted to experimental treatment protocol were used, before (M0) and after treatment (M6 and M12). For identification and quantification of amastigote forms of *L. (L.) infantum chagasi* was applied immunohistochemical technique (IHC). At time zero, 66.7% (12/18) of the dogs showed immunostaining with 40% (7/18) and 28% (5/18) of these dogs with high and low parasite densities respectively. After six months of treatment (M6), only 16.7% (3/18) remained positive in IHC and after twelve months (M12) weren't found amastigote forms of *L. (L.) infantum chagasi* in the skin of any animal. The results obtained can be concluded that the drug combination used was effective on reducing clinical signs and on the complete disappearance of amastigotes in the skin of animals naturally infected by *L. (L.) infantum chagasi*.

Keywords : Dogs – Immunohistochemical - parasitic load

1 - INTRODUÇÃO

No Brasil a infecção natural ou experimental por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em caninos domésticos pode produzir uma variedade de sinais clínicos, na dependência da resposta imune bem como pela deposição de imunocomplexos em vários órgãos (ALVAR et al. 2004), levando o aparecimento de animais assintomáticos e sintomáticos.

Nos cães com sintomatologia clínica, as dermatopatias, estão presentes em 60-90% dos animais (AMUSATEGUI et al., 2003; ALVAR et al., 2004), podendo ser observados diferentes tipos de lesões em função da idade e sua evolução (FONDATI; FONDEVITA, 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; BANETH, 2006; CALABRESE, et al., 2010).

Do ponto de vista epidemiológico, os cães tem sido considerado importantes reservatórios da infecção em função do intenso parasitismo cutâneo, independente de presença de dermatopatia (DUTRA et al., 1985; VERÇOSA et al., 2008). Contudo o parasitismo cutâneo não ocorre na mesma intensidade nas diferentes fases de evolução da doença, particularmente em função da resposta imune.

Por outro lado, vários trabalhos têm sido realizados na tentativa da padronização do tratamento de cães infectados com *L. infantum chagasi* no Brasil (MAYRINK et al., 2006; SILVA, 2012; CIARLINI et al., 2010; IKEDA-GARCIA, et al., 2010), sendo evidenciado que na maior parte dos casos ocorre a cura clínica, no entanto (IKEDA-GARCIA et al., 2007; KOUTINAS et al., 2001; MIRO et al., 2009).

Neste contexto a quantificação do parasitismo em diversos tecidos tem sido proposto no monitoramento da resposta aos diversos produtos com atividade leishmanicida ou leishmaniostática (MARY et al., 2006; ROMERO et al., 2010).

Sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a densidade parasitária da pele de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submetidos a tratamento experimental.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 18 cães domiciliados, de ambos os sexos, de raça e idade variadas, provenientes da Região Metropolitana do Recife, atendidos no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário (HV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, registrado sob o protocolo de número 077/2014.

Todos os animais apresentavam quadro clínico sugestivo de LVC e apresentavam-se sororreagentes a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ao teste Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e confirmados pelos testes parasitológicos (biópsia de medula óssea, aspirado de linfonodos e citologia esfoliativa) pesquisa das formas amastigotas da *L. (L.) infantum chagasi*.

Avaliação Clínica

Os animais foram avaliados do ponto de vista clínico, seguindo as normas semiológicas observando as alterações orgânicas sugestivas de LVC (FERRER, 1999). Foram considerados aptos ao tratamento aqueles animais que mostraram boa condição corporal e ausência de patologias associadas.

Após o processo de triagem, os animais foram mantidos domiciliados, e permaneceram durante todo o período experimental com uma coleira parasiticida a base de deltametrina, substituída a cada quatro meses, bem como aplicação mensalmente permetrina “pour-on”.

Protocolo de Tratamento

Os animais foram submetidos ao protocolo de tratamento para LVC com Alopurinol na dose de 10 mg/kg a cada 12 horas e domperidona 1 mg/kg a cada 24 horas, por via oral, durante todo o período do experimento, associado a aplicação de três doses da vacina inativada e de subunidade, sendo uma fração glicoprotéica purificada, com intervalo de 21 dias, por via subcutânea, na diluição de duas partes do liofilizado para uma do diluente, sendo realizadas avaliações clínicas e laboratorial nos momentos zero (M0), seis meses (M6) e doze meses (12M).

Biópsias cutâneas

Para a identificação e quantificação de formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi coletado fragmento de pele de oito milímetros (mm) de cada animal, através de um *punch* da região entre as escápulas sendo a pele posteriormente suturada posteriormente. O material coletado foi imediatamente fixado em formol a 10% tamponado com fosfato de sódio 0,01M e pH 7,3 por no máximo 48 horas e, em seguida, armazenados em álcool a 70% até o processamento.

Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ), foi realizada pela estreptoavidina-peroxidase para detecção de formas amastigotas da *L. infantum*, segundo Tafuri et al. (2004). Os fragmentos de pele fixados em formol tamponado a 10% foram submetidos às técnicas rotineiras de inclusão em parafina e os cortes submetidos a IHQ.

Avaliação da densidade de parasitos

A densidade parasitária da pele foi avaliada através dos cortes imunomarcados, nos momentos M0, M6 e M12. A análise foi quantitativa levando em consideração a média do número de formas amastigotas encontradas em cinco campos observados (440X) ao microscópio ótico. Em seguida, a densidade foi classificada em Baixa (<400), Média (=400) e Alta (>400). Em cada reação foi realizado um controle positivo e um negativo para as imunomarcações.

Análise Estatística

Para a análise estatística da carga parasitária entre os tempos M0, M6 e M12 foi utilizado o Teste de Friedmann, Software BioEstat 5.0 considerando o nível significância $p= 0,002$ (AYRES et al., 2007).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais apresentavam pelo menos um sinal clínico para leishmaniose visceral canina, sendo as dermatopatias, particularmente a dermatite descamativa observada em 83% (14/18) dos cães no momento zero

Este resultado esta em concordância com Torres-Neto, et al (2008), que observaram este tipo de dermatopatia na infecção canina por *L. (L.) infantum chagasi*.

A dermatite descamativa tem sido um dos padrões dermatológicos mais visibilizadas na Leishmaniose Visceral Canina (LVC), estando associada a uma maior imunidade a infecção (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005), com a participação das citocinas linfo-histiocitárias (SUTER et al. 1997).

Na avaliação da densidade parasitaria pela IHQ de pele do momento zero, 66,7% (12/18) dos cães apresentaram imunomarcção com 40% (7/18) e 28% (5/18) dos animais apresentando alta e baixa densidades parasitária respectivamente. (Figura1: A; Tabela 1).

Esses resultados são superiores aqueles apresentados por Laurenti et al., (2013) no qual encontraram o parasitismo cutâneo de 58,7% (14/24) e Queiroz et al. (2011) que detectaram 44,4 % dos cães sintomáticos.

Apesar de ter sido estabelecido a importância da pele na transmissão da LVC, independentemente da presença ou não de sintomatologia, em função da alta carga parasitária neste órgão (ABRANCHES et al., 1991), não existe um consenso para importância deste órgão (LAURENTI et al.,2013)

A densidade parasitária aqui observada pode ter sido causada por um intenso infiltrado inflamatório, o qual não pode ser comparado com outros estudos em função da idade da lesão e sua evolução, já que todos os animais apresentavam dermatopatias.

Após seis meses de tratamento (M6), apenas 16,7% (3/18) permaneceram positivos na IHQ, sendo, entretanto observada a redução densidade parasitária na pele desses cães e melhora clínica.

Este resultado é semelhante aqueles observados por Ikeda-Garcia, et al., (2010), que observaram este mesmo padrão após o tratamento de cães com antimoniatto de meglumine a alopurinol, assim como Koutinas et al., (2001), Manna, et al., (2009), que observaram o mesmo perfil.

A densidade parasitária reduzida após o tratamento pode ser explicada, não só por ação direta leishmanioestática do alopurinol, mas também pela eventual ativação da imunidade mediada por células pela domperidona (RIBEIRO, 2007; GOMEZ-OCHOA, et al., 2009; REIS, et al., 2009).

No M12 não foram encontradas formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* na pele de nenhum dos animais avaliados (Figura 1: B).

Estes resultados foram superiores aqueles observados por Baneth et al., (2002); Manna, et al (2009); Silva, et al (2012); e Authanasiou, et al (2013) que após tratamento de animais com LVC, não foi possível observar o desaparecimento completo de formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* na pele sim apenas a redução.

É importante notar que o tratamento aqui utilizado, resultou na diminuição significativa na densidade parasitária na pele entre os M0 e M6 ($p < 0,05$), bem como no M12 em relação ao M0 ($p < 0,05$), nos quais as formas amastigotas de *L.(L.) infantum chagasi* estavam ausentes em todas as amostras analisadas.

Não obstante futuros trabalhos devem ser realizados para avaliar a positividade da pele para os vetores flebotomíneos.

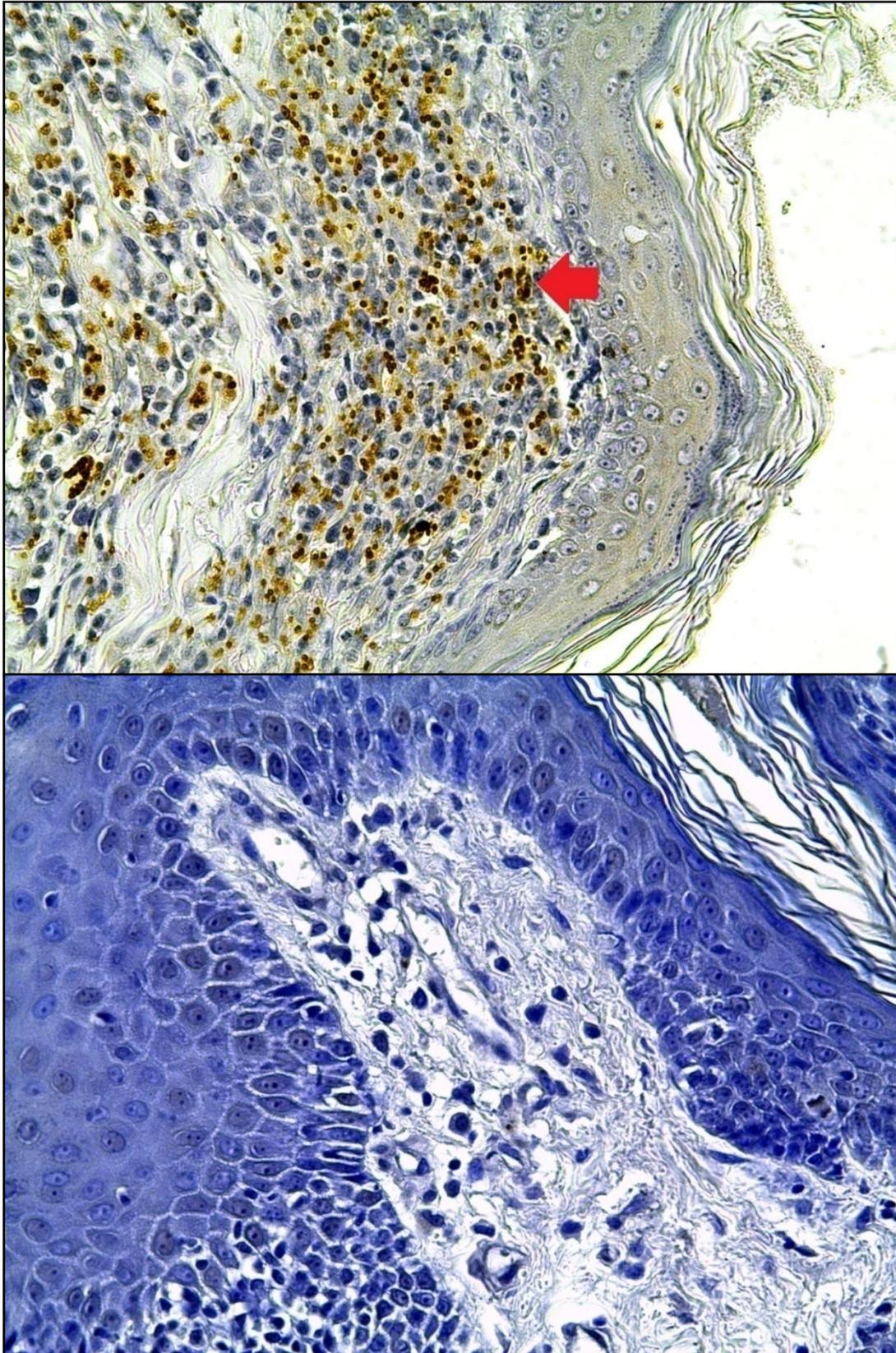


Figura 1: **A** – na seta vermelha imunomarcção de formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* na pele cão no M0; **B** – IHQ negativa de pele de cão no M12.(400X).

Tabela 1: Resultados da quantificação da carga parasitária nas amostras de pele de cães com LV antes (M0) e após os tratamentos (M6 e M12). Método de imunohistoquímica.

ANIMAIS	M0	M6	M12
1	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
2	A	AUSENTE	AUSENTE
3	B	AUSENTE	AUSENTE
4	A	AUSENTE	AUSENTE
5	B	AUSENTE	AUSENTE
6	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
7	A	AUSENTE	AUSENTE
8	B	AUSENTE	AUSENTE
9	A	AUSENTE	AUSENTE
10	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
11	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
12	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
13	A	B	AUSENTE
14	A	B	AUSENTE
15	A	B	AUSENTE
16	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
17	B	AUSENTE	AUSENTE
18	B	AUSENTE	AUSENTE

Carga Parasitária: Baixa < 400 (B), Média =400 (M) e Alta > 400 (A)

4 - CONCLUSÃO

Baseado nos resultados aqui obtidos pode-se concluir que a associação de fármacos aqui utilizada foi efetivo na redução dos sinais clínicos e no completo desaparecimento das formas amastigotas na pele dos animais com infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi*.

5 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. M.; SANTOS-GOMES, G. M.; JANZ, J. G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **The Journal of Parasitology**, p. 557-561, 1991.

ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUZA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127 (3-4), p. 227-232, 2005.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÍGUEZ F.; TESOURO M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal Epidemiology**, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.

ALVAR, J., CAÑAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advance Parasitology**, v. 57, p. 1-87, 2004.

AYRES M, AYRES JUNIOR, AIRES DL, SANTOS AS. *Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas de Ciências Biológicas e Médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília: CNPq. 2007.

BANETH, G; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p.315-314, 2002.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3ª ed. Canada: **Saunders Elsevier**, cap. 73, p. 685-698, 2006.

CALABRESE, K. S. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 253-257, 2010.

CIARLINI, P. C.; VALADARES, T.C.; IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES M.; LIMA, V.M.L F. leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o Tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 369-375, abr./jun. 2010.

DANTAS-TORRES F.; BRANDÃO-FILHO S.P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical** v. 39, p. 352-356, 2006.

DUTRA, M.; MARTINELLI, R.; DE CARVALHO, E. M.; RODRIGUES, L. E.; BRITO, E.; ROCHA, H. Renal involvement in visceral leishmaniasis. **American Journal of Kidney Diseases**, v.6, n.1, p. 22-27, 1985.

FONDATI, A.; FONDEVILA, D. Dermatological aspects of canine leishmaniosis: clinical and histopathological cases In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS, 1., 2004, Nápoles. **Abstract book of the**

International congress on canine leishmaniasis, Nápoles: [s.n]p 39-41, 2004.

IKEDA-GARCIA, F.A.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; LIMA, V.M.F.; MORINISHI, C.K.; BONELLO, F.L.; ZANETTE, M.F.; PERRI, S.H.V.; MARCONDES, M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.3-4, p. 254-259, 2007.

IKEDA-GARCIA, F.A.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; CIARLINI, P.C.; MORINISHI, C.K.; ZANETTE, M.F.; PERRI, S.H.V.; MARCONDES, M. Clinical and Parasitological of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania)chagasi* submitted to treatment with meglumine antimonite and allopurinol. **Brazilian journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n.3. p. 218-223, 2010.

KOUTINAS AF, SARIDOMICHELAKIS MN, MYLONAKIS ME, LEONTIDES L, POLIZOPOULOU Z, BILLINIS C, ARGYRIADIS D, DIAKOU N, PAPAPOPOULOS O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 247-261, 2001.

LAINSON R., RANGEL E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 100(8): 811-827, December 2005.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. da; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E.; SACUNDINO, N. F.; PIMENTA, P. F.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, 2013.

LIMA, V.M.F. et.al. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rk39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 330-333, 2010.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; PICILLO, E.; NEGLIA, G.; VESCIO, F.; GRAVINO, A. E. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 3, p. 441-445, 2009.

MAYRINK, W.; BOTELHO, A. C. D. C.; MAGALHÃES, P. A.; BATISTA, S. M.; LIMA; A. D. O., GENARO, O.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.1, p. 14-21, 2006.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, n.11, p.5249-5255, 2004.

MIRÓ, G.; OLIVA, G.; CRUZ, I.; CAÑAVATE, C.; MORTARINO, M.; VISCHER, C.; BIANCIARDI, P. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. **Veterinary Dermatology**, v. 20 n.5-6, p. 397-404, 2009.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; NUNES, C.M.; SILVA, T. C. C.; LAURENTI, M. D.; CORBERTT, C. E. P. Application of direct immunofluorescence technic for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in lymph nodes aspirates. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 103-106, 2002.

OLIVA, G.; ROURA, X.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; CASTAGNARO, M.; GRADONI, L.; LUBAS, G.; PALTRINIERI, S.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 236, n. 11, p. 1192-1198, 2010.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; VLEMMAS, J.; LEKKAS, S.; KARAMERIS, A.; FYTIANOU, A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 104, n.3, p. 227-237, 2005.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin, **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 1-8, 2011.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 68-75, 2006.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspecto de tratamento e controle. **Revista clínica veterinária**, n.71 p. 66-76, 2007.

ROMERO, G. A.S; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. 584, 2010.

SILVA, S. M.; AMORIM, I. F. G.; RIBEIRO, R.R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELI, C.; M. N. M.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N.F.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARDC, F. Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. **American Society for Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 2858–2867, June 2012.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILLA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*

infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 130, p. 7-12, 2004.

SUTER, M. M.; CRAMERI, F. M.; OLIVRY, T.; MUELLER, E.; VOTSCHARNER, C.; JENSEN, P. J. Keratinocyte biology and pathology. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 67-100, 1997.

TAFURI, W.L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, p. 17-23, 2004.

TORRES-NETO, R. et al. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 667-676, 2008.

VERÇOSA, B. L. A.; LEMOS C.M.; MENDONÇA I.L.; SILVA S.M.; CARVALHO S.M.; GOTO H.; COSTA F. A. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 4, n. 45, 2008.

ARTIGO 3

**MONITORAMENTO POR PCR EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS
POR *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* SUBMETIDOS A
TRATAMENTO COM ALUPORINOL, DOMPERIDONA E VACINA**

**MONITORAMENTO POR PCR EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS
POR *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* SUBMETIDOS A
TRATAMENTO COM ALUPORINOL, DOMPERIDONA E VACINA**

Follow-up by PCR of naturally infected dogs *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* treated by allopurinol, domperidone e vaccine

Resumo: A leishmaniose visceral é uma importante endemia no Brasil, causada pela espécie de protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. É transmitida através da picada do mosquito *Lutzomyia longipalpis*, e o cão doméstico é o principal reservatório urbano. O objetivo do presente trabalho foi monitorar através da Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) os animais com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submetidos ao tratamento com alopurinol, domperidona e vacina. Foram utilizados 18 cães domiciliados, de ambos os sexos e idades variadas, submetidos ao protocolo de tratamento para leishmaniose visceral, com Alopurinol 10 mg/kg a cada 12 horas e domperidona 1 mg/kg a cada 24 horas, por via oral, associado com três doses da vacina inativada, e avaliados nos momentos zero (M0), seis meses (M6) e doze meses (12M). Os cães no M0, 66,66% (12/18) apresentaram amplificação de fragmentos de DNA de 120 pares de base (pb) de *L. (L.) infantum chagasi* na pele e 100% (18/18) na medula óssea. Após seis meses de tratamento houve uma redução de 75% e 11,11% na positividade da pele e medula óssea respectivamente. No M12, 5,55% (1/18) e 88,88% (16/18) dos animais foram positivos a PCR na pele ($p=0,0001$) e medula óssea ($p>0,005$) respectivamente. A PCR demonstrou ser uma ferramenta útil no monitoramento de cães com infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi* submetidos ao tratamento de alopurinol associado à domperidona e a vacina inativada e de subunidade.

Palavras-chaves – PCR - Pele – medula óssea

Abstract - Visceral leishmaniasis is an important endemic disease in Brazil, caused by the species of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. It is transmitted through mosquito bites *Lutzomyia longipalpis*, and the domestic dog is the main urban reservoir. This study aimed to follow-up through the Polymerase Chain Reaction (PCR) animals naturally infected by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submitted to treatment with allopurinol, domperidone and vaccine. 18 pet dogs were used of both sexes and various ages submitted to the treatment protocol for visceral leishmaniasis, with allopurinol 10 mg / kg every 12 hours and domperidone 1 mg / kg every 24 hours, orally, associated with three doses of inactivated vaccine, and evaluated in moments zero (M0), six months (M6) and twelve months (12M). The dogs in M0, 66.66% (12/18) showed amplification of 120 base pairs DNA fragments (bp) *L. (L.) infantum chagasi* skin and 100% (18/18) in the bone marrow. After six months of treatment were observed a decrease of 75% and 11.11% in skin and bone marrow positivity respectively. At M12, 5.55% (1/18) and 88.88% (16/18) of the animals were PCR positive in the skin ($p = 0, 0001$) and bone marrow ($p < 0.005$) respectively. PCR showed to be an useful tool in tracking dogs naturally infected with *L. (L.) infantum chagasi* submitted to the treatment of allopurinol associated with domperidone and the inactivated and subunit vaccine.

Keywords – PCR – Skin - bone marrow

1 – INTRODUÇÃO

Em áreas endêmicas para leishmaniose Visceral (LV), os cães tem sido apontados como principal reservatório urbano da *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (FRAGA et al., 2012), podendo apresentar diferentes formas clínicas a saber: assintomáticos ou polissintomáticos (CABRAL et al., 1998; MOLINA et al., 1994).

Sendo assim, além de diagnóstico precoce e o tratamento adequado dos casos humanos, o emprego de inseticidas de ação residual e medidas de saneamento do meio doméstico para a redução da densidade vetorial e a identificação e eliminação do reservatório doméstico tem sido recomendada (ASHFORD et al, 1998).

Apesar da alta taxa de eliminação de cães (ANDRADE et al., 2007), não houve redução das taxas de prevalência na população humana (VIEIRA ; COELHO, 1998; COSTA ; VIEIRA, 2001).

Por outro lado, o tratamento da doença canina tem sido descrito na tentativa da remissão dos sinais clínicos e principalmente redução na capacidade infectante dos animais (NOLI; AUXILIA, 2005; IKEDA-GARCIA et al., 2007; RIBEIRO, et al., 2008; GOMEZ-OCHOA et al., 2009; CIARLINI et al., 2010; TRIGO et al., 2010; MIRÓ et al, 2011; TORRES, et al., 2011; SILVA, et al., 2012; ARITI, et al., 2013; ATHANASIOU, et al., 2013).

Neste sentido uma variedade de testes parasitológicos, sorológicos e moleculares tem sido utilizados para monitorar os animais após o tratamento (ALVAR et al., 1994; FERRER et al., 1995; BOURDOISEAU et al., 1997; FERNANDEZ-PEREZ et al., 1999).

O objetivo do presente estudo foi monitorar através da Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) os animais com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* submetidos ao tratamento com alopurinol, domperidona e vacina.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 18 cães domiciliados, de ambos os sexos, de raça e idade variadas, provenientes da Região Metropolitana do Recife, atendidos no

serviço ambulatorial do Hospital Veterinário (HV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, registrado sob o protocolo de número 077/2014.

Todos os animais apresentavam quadro clínico sugestivo de LVC e apresentavam-se sororreagentes a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ao teste Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e confirmados pelos testes parasitológicos (biópsia de medula óssea, aspirado de linfonodos e citologia esfoliativa) pesquisa das formas amastigotas da *L. (L.) infantum chagasi*.

Avaliação Clínica

Os animais foram avaliados do ponto de vista clínico, seguindo as normas semiológicas observando as alterações orgânicas sugestivas de LVC (FERRER, 1999). Foram considerados aptos ao tratamento aqueles animais que mostraram boa condição corporal e ausência de patologias associadas.

Após o processo de triagem, os animais foram mantidos domiciliados, e permaneceram durante todo o período experimental com uma coleira parasiticida a base de deltametrina, substituída a cada quatro meses, bem como aplicação mensalmente permetrina “pour-on”.

Protocolo de Tratamento

Os animais foram submetidos ao protocolo de tratamento para LVC com Alopurinol na dose de 10 mg/kg a cada 12 horas e domperidona 1 mg/kg a cada 24 horas, por via oral, durante todo o período do experimento, associado a aplicação de três doses da vacina inativada e de subunidade, sendo uma fração glicoprotéica purificada, com intervalo de 21 dias, por via subcutânea, na diluição de duas partes do liofilizado para uma do diluente, sendo realizadas avaliações clínicas e laboratorial nos momentos zero (M0), seis meses (M6) e doze meses (12M).

Amostras Biológicas

As amostras de pele foram obtidas após o bloqueio anestésico na região do cotovelo esquerdo, por meio da administração de cloridrato de lidocaína na dose de 7mg/kg por via subcutânea a fim de promover anestesia local da região da coleta. Os fragmentos de pele foram coletados com auxílio de “punch” com diâmetro de 8 mm. O material coletado foi congelado e mantido a temperatura de -20°C para posterior extração de DNA.

A punção de medula foi realizada com os animais sedados por via intramuscular ketamina 11mg/kg e xilazina 1,1 mg/kg. Em seguida realizou-se a assepsia da região esternal, onde foi introduzida uma agulha 40X12mm acoplada em uma seringa de 20,0mL, seguindo-se a aspiração da medula óssea. De cada animal foi aspirada uma alíquota do conteúdo, que foi imediatamente transferido para tubos plásticos de polipropileno, congelado e mantido a temperatura de -20°C para posterior análise.

Análise Estatística

Empregou-se o teste dos sinais para a comparação de cada tecido e entre eles, em diferentes momentos, utilizando o programa software BioEstat 5.0 (AYRES, et al., 2007).

REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE (PCR)

Extração de DNA de tecidos

As extrações de DNA das amostras de medula óssea e pele, foram realizadas utilizando o kit “*DNeasy Blood & Tissue Kit*®” (Quiagen Inc., EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Amplificação do Complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*

Utilizou-se volumes de 25µl para cada reação, sendo: 2,5µL de Tampão 200mM Tris-HCl; 500mM KCl; pH 8,4), 1µL de MgCl₂ (1,5 mM), 2µL de dNTPs (10mM cada), 2,5µL de cada primer (10 pmol/µL), 0,125µL de Taq polimerase (5U/µL), quantidade suficiente de água ultrapura para completar 20µL e 5 µL de DNA (10ng/µL)

A amplificação de fragmentos de DNA de 120 pares de base (pb) foram conduzidas em termociclador com ciclos de: 1 ciclo D 94°C – 2 min, e 30 ciclos D 94°C – 20 seg, A 60 °C – 20 seg, E 72°C – 30 seg, E final 72°C – 5 min .

Para a PCR do complexo *L. (L.) donovani* foram utilizados primers MC1: (5' – GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG – 3') e MC2: (5' – CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG – 3') descritos por CORTES et al. (2004).

Como controle positivo foi utilizado DNA de cão naturalmente infectado por *L. (L.) infantum chagasi*. Por sua vez, para o controle negativo foi utilizado DNA de cão livre do parasito.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% corado com corante comercial Blue Green (LGC) em tampão de corrida TBE 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44M ácido bórico; 12,49mM EDTA).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos animais que iniciaram o tratamento, 100% (18/18) apresentavam sinais clínicos sugestivos, particularmente as dermatopatias 89% (16/18), linfadenomegalia em 72% (13/18), lesões oftálmicas em 56% (10/18), emagrecimento em 28% (5/18) e atrofia da musculatura em 22% (4/18) dos animais.

O quadro clínico nos cães portadores de LV tem sido descrito como bastante variado, devido à influência da própria resposta imune em controlar a replicação do parasita (SILVA, 2007; ALMEIDA, et al., 2010; ALEXANDRE PIRES, et al., 2010; IKEDA-GARCIA, et al. 2010; CASTRO, et al., 2012) e assemelham-se aqueles reportados por outros autores na avaliação clínica pré-tratamento de animais com leishmaniose visceral canina (FERRER, 2002; COSTA VAL, 2007; ALMEIDA et al., 2005; AGUIAR, et al., 2007; CASTRO, et al., 2012; FREITAS, et al., 2012; ATHANASIOU, et al., 2013).

Houve remissão significativa e progressiva dos sinais clínicos entre os M6 e M12 em relação ao M0.

A administração do alopurinol em cães com LV aqui utilizado não proporcionou a cura parasitológica, apenas a redução da carga parasitária. Este fato tem sido observado também em animais com LV tratados com

antimoniais (CAVALIERO et al., 1999; PENNISI et al., 2005). Por outro lado a domperidona tem mostrado ser efetivo na redução dos sinais clínicos (GOMEZ-OCHOA et al., 2009)

Sendo assim a administração do alopurinol em associações com outros fármacos por longo prazo tem demonstrado uma boa opção, devido sua baixa toxicidade e significativa diminuição na taxa de recaídas devido a sua atuação leishmanioestático (NOLI; AUXILIA, 2005; SILVA 2007).

Quando do monitoramento da infecção dos cães no M0, 66,66% (12/18) dos animais apresentaram amplificação de fragmentos de DNA de 120 pares de base (pb) de *L. (L.) infantum chagasi* na pele e 100% (18/18) na medula óssea. Após seis meses de tratamento houve uma redução de 75% e 11,11% na positividade da pele e medula óssea respectivamente (Tabela 1). Houve diferença significativa ($p= 0,0005$) entre os M0 e M6 com relação à pele.

A técnica da PCR foi escolhida para monitorar a infecção por *L. (L.) infantum chagasi* em cães aqui tratados em função da sensibilidade na detecção do DNA do parasito nas amostras biológicas (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; MANNA, et al. 2009; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014), aliado a rapidez do diagnóstico.

Os resultados aqui encontrados com relação ao parasitismo na pele podem ser decorrentes a diminuição densidade parasitária, devido à ação leishmanioestática do alopurinol, e possivelmente pelo estímulo da resposta imunológica gerada domperidona e pela vacina (GOMEZ-OCHOA et al., 2009; CABRERA et. al., 2012).

No que concerne ao monitoramento da infecção dos cães no M12, 5,55% (1/18) e 88,88% (16/18) dos animais foram positivos a PCR na pele ($p= 0,0001$ e medula óssea ($p> 0,005$) respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequência de positivos na PCR em diferentes amostras biológicas de cães antes e após-tratamento

Amostras	PCR (%)
----------	---------

	M0	M6	M12
Pele	66,66% (12/18)	16,66% (03/ 18)	5,55% (01/ 18)
Medula Óssea	100% (18/ 18)	88,88% (16/18)	88,88% (16/18)

A carga parasitária residual após a administração dos fármacos, já tem sido mencionada (MANNA et al. 2009; ARITI et al 2013) onde ocorre a remissão dos sintomas e redução da carga parasitária, mas não a eliminação do parasita (MANNA et al. 2009; ARITI et al 2013), particularmente na pele.

Vale salientar a redução da carga parasitária na pele entre M0 e M12, sugere a interrupção da transmissão de forma considerável, concordando com Travi (2014) sobre a viabilidade da terapêutica.

Por outro lado, os resultados aqui obtidos são semelhantes aqueles observados por Athanasiou et al (2013) e Hernandez et al (2014) que relataram diminuição de animais positivos na PCR de medula óssea pós tratamento.

Apesar da redução aqui observada, Ferrer (1997) assegura que o tratamento de cães com LV só deve ser cessado quando a PCR da medula óssea resultar negativa por duas vezes consecutivos em um intervalo de 12 meses, o que não foi obtido no presente estudo.

4 - CONCLUSÃO

A PCR demonstrou ser uma ferramenta útil no monitoramento de cães com infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi* submetidos ao tratamento de alopurinol associado à domperidona e a vacina inativada e de subunidade.

5 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P. et al. Canine Leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 4, p. 557-561, 1991.

AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D. V.; DA COSTA, R. L. G.; JULIÃO, F. D. S., ... ; MELO, S. M. B. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p. 283-294, out/dez, 2007.

ALEXANDRE-PIRES, G.; BRITO, M. T. de.; ALGUERÓ, C.; MARTINS, C.; RODRIGUES, O. R.; FONSECA, I. P.; SANTOS-GOMES, G. Canine Leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 137, n. 3-4, p. 275-283, 2010.

ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUSA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A.; ATTA, A.M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.106, n.1-2, p.151-58, 2005.

ALMEIDA, A. D. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalence and epidemiology of visceral Leishmaniasis in dogs and humans in the city Cuiaba, Mato Grosso, Brazil. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p. 1610-1615, 2010.

ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRÉS, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; SAN ANDRÉS, M.D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SÁINZI, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological followup after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.88, n.4, p.371-378, 1994.

ANDRADE, P.P.; REIS, A.B.; GONTIJO, F.M.C.; BRAGA, B.L.; ROCHA, R.D.R.; ARAUJO, M.S.S.; VIANNA, R.L.; MARTINS-FILHO, A.O. Clinical value of anti- *Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, n. 1-2, p.85-97, 2007.

ARITI, G.; NARDONI, S.; PAPINI, R.; MUGNAINI, L.; GIANNETTI, G.; BIZZETI, M.; FANETTI, N.; MANCIANTI, F. Treatment of canine leishmaniasis: long term molecular and serological observations. **Medycyna Weterynaryjna**, v.69, n.2, 2013.

ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M. D. C.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.59, n.1, p.53-57, 1998.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J.P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections

of canine skin and lymph nodes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n. 4, p. 439-440, 1997.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.E.; GOMES, S.; SOUSA, J.C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v.76, p. 173–180, 1998.

CASTRO, I. P.; SOUSA, M. V. C.; MAGALHÃES, G. M.; MUNDIM, A. V.; NOLETO, P.G.; PAULA. M. B. C.; PAJUABA NETO, A. A.; MEDEIROS, A. A. Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral. **Bioscience Journal.**, n. 5, v. 28, p. 799-804, 2012.

CAVALIERO, T.; ARNOLD, P.; MATHIS, A.; GLAUS, T.; HOFMANN-LEHMANN, R.; DEPLAZES, P. Clinical, Serologic, and Parasitologic Follow-Up after Long-Term Allopurinol Therapy of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Journal of veterinary internal medicine**, v.13, n.4, p. 330-334, 1999.

CIARLINI, P. C.; VALADARES, T.C.; IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES M.; LIMA, V.M.L F. leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o Tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 369-375, abr./jun. 2010.

COSTA C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.44, p. 232-242, 2011.

COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; GONTIGO, N.F.; MICHALIK, M.S.M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, v.174, p.636–643, 2007.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n.2, p. 223-228, 2001.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J.; MENDEZ, S.; DE LA FUENTE, C.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J. M. Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.61, n.4, p.652-653, 1999.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. (Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v.136, n.20, p.514-516, 1995.

FERRER, L. Leishmaniasis: update in diagnosis and therapy. **Proceedings ESVD congress PISA**, 1997.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In **International Canine Leishmaniasis Forum** v. 1, p. 6-10, 1999.

FERRER L. Canine Leishmaniosis: evaluation of the immunocompromised patient. In: **WSAVA Congress Choose**, 8, Granada. Proceedings; p.78-95, 2002.

FRAGA, D. B. M.; SOLCA, M. S.; SILVA, V. M. G.; BORJA, L. S.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G. S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; VERAS, P. S. T.; DOS-SANTOS, W. L. C. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 591-594, 2012.

FREITAS, J. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C.; LOPES NETO, B. E.; SANTOS, G. J.; ABREU, C. R.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.

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

HERNANDEZ L, GÁLVEZ R, MONTOYA A, CHECA R, BELLO A. First study on efficacy and tolerability of a new alkylphosphocholine molecule (oleylphosphocholine-OIPC) in the treatment of canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Parasitology research**, v. 113, p.157–164.

IKEDA-GARCIA, F.A.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; LIMA, V.M.F.; MORINISHI, C.K.; BONELLO, F.L.; ZANETTE, M.F.; PERRI, S.H.V.; MARCONDES, M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.3-4, p. 254-259, 2007.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PICILLO, E.; PAVONE, L. M.; GRAVINO, A. E. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Veterinary Journal** v. 177, p. 279-282, 2008.

MANNA L.; VITALE F.; REALE S.; PICILLO E.; NEGLIA G.; VESCIO F.; GRAVINO A. E. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Journal**, v. 182, p. 441-445, 2009.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, n.11, p.5249-5255, 2004.

MIRÓ, G., GÁLVEZ, R., FRAILE, C., DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasites e Vectors**, v.4,p. 52, 2011.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J., SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J. A.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.88, n.4, p.491-493, 1994.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary dermatology**, v. 16, n. 4, p. 213-232, 2005.

NOLI, C ; SARIDOMICHELAKIS M. N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **The Veterinary Journal**, 2014.

PENNISI, M. G.; REALE, S.; GIUDICE, S. L.; MASUCCI, M.; CARACAPPA, S.; VITALE, M.; VITALE, F. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. **Veterinary research communications**, v.29, p. 301-303, 2005.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspecto de tratamento e controle. **Revista clínica veterinária**, n.71 p. 66-76, 2007.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, 20p, 2007.

SILVA, S. M.; AMORIM, I. F. G.; RIBEIRO, R.R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELI, C.; M. N. M.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N.F.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARDC, F. Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. **American Society for Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 2858–2867 June 2012.

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

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and Immunohistochemical Study of Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum*-infected Dogs. **Journal Comparative of Pathology**, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004.

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

TRAVI, B. L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. **Biomédica**, v. 34, n. 1, p. 7-12, 2014.

TRIGO, J.; ABBEUSEN, M. NETTO, E. M.; NAKATANI, M.; PEDRAL-SAMPAIO, G.; JESUS, R. S.; GOTO, Y.; GUDERIAN, J.; HOWARD, R. F.; REED, S. G. Treatment of visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. **Vaccine**. 2010.

VIEIRA, J.B.F.; COELHO, G. E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 31, p. 85-92, 1998.

Apêndice

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
Portador do RG _____, CPF nº _____ residente à
rua/Av. _____
_____, bairro _____
_____, cidade/estado _____,
CEP: _____, abaixo assinado atesto que entendi o conteúdo deste
consentimento informado e concordo de livre e espontânea vontade em
participar do estudo sobre Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina

submetendo meu animal à tal. Declaro ainda, que esclareci todas as minhas dúvidas com os responsáveis pela pesquisa e autorizo a publicação dos dados e/ou fotos.

Assinatura do Tutor/Proprietário

Data ___/___/___

Testemunha

Data ___/___/___

Assinatura de um dos responsáveis pela pesquisa

Data ___/___/___

Recife, _____ de _____ de _____



Universidade Federal Rural de Pernambuco
PRONTUÁRIO MÉDICO VETERINÁRIO
Hospital Veterinário - Animais em Tratamento LVC



DATA: ___/___/___
Nº: _____

IDENTIFICAÇÃO

ANIMAL:

Nome: _____ Raça: _____ Sexo: _____ Peso: _____ Idade: _____

PROPIETÁRIO:

Nome: _____ Data de
nascimento: ___/___/___

