

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**"AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR LEISHMANIOSE
VISCERAL, SUBMETIDOS À TERAPIA
COM ANFOTERICINA B"**

FÁBIO DOS SANTOS NOGUEIRA

BOTUCATU - SP
MAIO / 2007

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**"AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR LEISHMANIOSE
VISCERAL, SUBMETIDOS À TERAPIA
COM ANFOTERICINA B"**

FÁBIO DOS SANTOS NOGUEIRA

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Ass. Dr. Flávio Quaresma Moutinho

BOTUCATU - SP
MAIO / 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Nogueira, Fábio dos Santos.

Avaliação clínico-laboratorial de cães naturalmente infectados por Leishmaniose visceral, submetidos à terapia com anfotericina B / Fábio dos Santos Nogueira. – Botucatu [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Flávio Quaresma Moutinho

Assunto CAPES: 50503022

1. Leishmaniose canina - Tratamento - Estudos experimentais

CDD 636.708969364

Palavras-chave: Alopurinol; Anfotericina b; Cães; Leishmaniose; Tratamento

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr Flávio Quaresma Moutinho
Julgamento: _____

- FMVZ – UNESP Botucatu - SP
Assinatura: _____

Prof. Ass. Dra Maria Cecília Rui Luvizotto
Julgamento: _____

- FMV – UNESP Araçatuba - SP
Assinatura: _____

Prof. Ass. Dra Noeme Sousa Rocha
Julgamento: _____

- FMVZ – UNESP Botucatu - SP
Assinatura: _____

Prof. Ass. Dra Mara Regina S. Balarin
Julgamento: _____

- FMVZ – UEL - Londrina - PR
Assinatura: _____

Prof. Ass. Dra Denise Saretta Schwartz
SP
Julgamento: _____

- FMVZ – USP – São Paulo -
Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Afrânio Gomes Nogueira e Eva Beatriz dos Santos Nogueira pelos conceitos de humildade, honestidade, e amor, transmitidos durante toda a minha vida.

A minha esposa Candice Mariani Santos Nogueira, pela paciência que teve durante a execução deste trabalho. Obrigado pelo amor, alegrias e tristezas.

Aos meus dois filhos Pietra Mariani Santos Nogueira e Fábio Mariani Santos Nogueira que cederam um pouco do seu tempo e participaram indiretamente do medo, angústia, e felicidade na execução deste trabalho.

Aos 13000 cães da cidade de Andradina, que foram submetidos à eutanásia, vítimas da Leishmaniose Visceral.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Grande Arquiteto do Universo, **Deus**, pela luz, amparo, e conforto em todos os momentos de minha vida.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Ass. **Dr. Flávio Quaresma Moutinho**, pela amizade, paciência, e ensinamentos transmitidos, durante todos estes anos de Mestrado e Doutorado.

À minha grande amiga Prof^a. Ass. **Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto**, pela confiança em meu trabalho, sinceridade, conhecimentos transmitidos, estímulo à pesquisa e alegria. Sua participação neste trabalho foi fundamental, não só pelos ensinamentos durante a pesquisa, mas sim para reforçar nossos conceitos defendidos.

À Prof. Ass. **Dra. Lídia Raquel de Carvalho**, pela orientação, análise estatística, e auxílio na elaboração dos gráficos.

À biblioteca, pela colaboração no levantamento bibliográfico, pela elaboração da ficha catalográfica e correção das referências bibliográficas.

Ao Serviço de Patologia da UFMG pela execução da análise imunoistoquímica.

Ao Serviço de Imunologia do Curso de Medicina Veterinária UNESP – Araçatuba pelo diagnóstico sorológico.

A todos os professores da FMVZ – UNESP Botucatu, em especial à Prof^a. Ass. **Dra. Noeme Sousa Rocha** e Prof^a. Ass. **Dra. Michiko Sakate**, meu agradecimento especial, pela amizade e companheirismo.

Ao Pós-graduando da FMVZ – UNESP Araçatuba **Heitor Ferrari**, pelo auxílio na digitalização das fotos.

Ao amigo e companheiro de pesquisa **Márcio Antônio Batistella Moreira** pelo auxílio na elaboração dos gráficos.

Ao meu sogro **Dr. Jurandy Santos** pelo auxílio na tradução e interpretação dos textos e a minha sogra **Marita Aparecida Mariani Santos**, que também participou indiretamente na elaboração deste trabalho.

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 - Variáveis estudadas submetidas a escores.....	33
QUADRO 2 - Valores de referência de bioquímica sérica.....	35
QUADRO 3 - Número absoluto e percentual de cães oligossintomáticos e sintomáticos, de acordo com as manifestações clínicas observadas no início do projeto.....	37
QUADRO 4 - Manifestações clínicas detectadas no exame físico dos animais oligossintomáticos, antes do tratamento.....	38
QUADRO 5 - Manifestações clínicas detectadas no exame físico dos animais sintomáticos, antes do tratamento.....	38
QUADRO 6 - Valores de creatinina sérica obtidos em cada momento.....	97
QUADRO 7 - Valores de uréia sérica obtidos em cada momento	98
QUADRO 8 - Valores de alanina aminotransferase sérica obtidos em cada momento	99
QUADRO 9 - Valores de aspartato aminotransferase sérica obtidos em cada momento.....	100
QUADRO 10 - Valores de Proteína total sérica obtidos em cada momento.....	101
QUADRO 11 - Valores de albumina sérica obtidos em cada momento.....	102
QUADRO 12 - Valores de globulina sérica obtidos em cada momento	103
QUADRO 13 - Valores da relação albumina / globulina sérica obtidos em cada momento.	104
QUADRO 14 - Sinais clínicos presentes em vários momentos, descritos em forma de escores.	105
QUADRO 15 - Valores do ensaio de ELISA em forma de escores.	106
QUADRO 16 - Valores de imunoistoquímica.....	107

QUADRO 17 -	Valores de Citologia Aspirativa de Linfonodo em	108
	forma de escores.....	

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Mediana, 1 ^o e 3 ^o quartil, entre colchetes, referentes aos escores das variáveis segundo momento.....	45
TABELA 2 - Valores médios e desvio padrão referente às variáveis Creatinina, Uréia, Aspartato aminotransferase e Alanina aminotransferase segundo momento.....	49
TABELA 3 - Média e desvio-padrão referentes às variáveis proteínas totais, albumina, globulina e relação albumina/globulina segundo momento.....	51

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1 -	Percentual de Manifestações Clínicas de animais oligossintomáticos e sintomáticos, antes do tratamento.....	39
FIGURA 2 -	Manifestações Clínicas de Leishmaniose Visceral Canina. (A) Emagrecimento; Onicogribose (B) Blefarite, Alopecia peri-ocular, Uveíte, Edema Corneal; (C) Linfoanodopatia acentuada; (D) Descamação cutânea, Rarefação pilosa, Atrofia de musculatura esquelética temporal.	40
FIGURA 3 -	Manifestações Clínicas de Leishmaniose Visceral Canina. A) Atrofia de musculatura esquelética temporal antes do início da terapia; Alopecia peri-ocular; (B) Remissão dos sinais clínicos 18 meses do início da terapia; (C) Descamação cutânea generalizada e rarefação pilosa; (D) Remissão dos sinais clínicos 18 meses do início da terapia.....	41
FIGURA 4 -	Caracterização citológica da punção aspirativa de linfonodo com agulha fina. A – Ausência de formas parasitárias e/ou reação linfóide; B - Reação Linfohistioplasmocitária; C - Formas amastigotas livres e no interior de macrófagos.....	42
FIGURA 5 -	Reação de imunoistoquímica positiva para <i>Leishmania sp</i> na biópsia de pele da região da pina (400x).....	45
FIGURA 6 -	Percentual de resultado positivo, negativo, e suspeito do teste ELISA, antes e após a terapia. A porcentagem de animais que foram à óbito também está incluída.....	46
FIGURA 7 -	Percentual de resultado positivo, negativo, e suspeito da punção aspirativa de linfonodo com agulha fina, antes e após a terapia.	47
FIGURA 8 -	Percentual de resultado positivo e negativo da reação de imunoistoquímica antes e após a terapia.....	47
FIGURA 9 -	Valores médios e desvio-padrão dos níveis séricos de Creatinina e Uréia, durante os momentos de	49

observação.

FIGURA 10 -	Valores médios e desvio-padrão dos níveis séricos de Aspartato aminotransferase e Alanina aminotransferase, durante os momentos de observação.....	50
FIGURA 11-	Valores médios e desvio-padrão dos níveis séricos de proteína total, albumina, globulina e relação Alb/Glob, nos momentos de observação.....	51

ABREVIATURAS

Alb: Albumina

Alb/Glob: Relação Albumina-Globulina

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

CAAF: Punção Aspirativa com agulha fina

Creat: Creatinina

Glob: Globulina

IFN- γ : Interferon gama

IHQ: Imunoistoquímica

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-12: Interleucina 12

KCS: Ceratoconjuntivite seca

LV: Leishmaniose Visceral

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

MS: Ministério da Saúde

NK: Células Killer

PCR: Reação em cadeia pela polimerase

Pt: Proteínas Totais

RIFI: Reação de Imunoflorescência Indireta

TNF: Fator de Necrose Tumoral

U: Uréia

NOGUEIRA, F.S. Avaliação Clínico-Laboratorial de cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral, submetidos à terapia com anfotericina B. Botucatu, 2007. Tese de Doutorado, 108p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Constituiu objetivo desta pesquisa avaliar experimentalmente os efeitos decorrentes do tratamento de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp., com anfotericina b em associação ao alopurinol e prednisona, avaliando as lesões hepática e renal, e principalmente a eficácia deste protocolo para o controle da doença por meio da sorologia, pesquisa de parasitos, e manifestações clínicas. Para tanto, foram utilizados 20 cães adultos, machos e fêmeas, soropositivos pelo teste ELISA. Todos os cães foram tratados com anfotericina b na dose de 0,5 mg/kg a cada 3 dias durante 16 aplicações, associado ao alopurinol na dose de 10 mg/kg/12horas durante 18 meses e prednisona 0,5 mg/kg/24 horas durante 8 semanas. O experimento foi realizado durante 18 meses, sendo que as variáveis foram analisadas em momentos diferentes. Os animais foram monitorados quanto à lesão renal e hepática por meio da concentração sérica de uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), e alanina aminotransferase (ALT) em 7 momentos: M0 – antes do tratamento, M1 – 14 dias, M2 – 28 dias, M3 – 42 dias, M4 – 56 dias, M5 – 12 meses e M6 – 18 meses. Os cães foram submetidos a exame físico rotineiro a cada 3 meses, e classificados em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Da mesma forma, nos momentos supramencionados, procedeu-se à análise do proteinograma, ou seja, da concentração sérica de proteína total, albumina, globulina e relação albumina/globulina. A pesquisa de anticorpos anti-leishmania e a análise imunoistoquímica, foram realizadas - antes do início da terapia e decorridos 18 meses. A pesquisa de formas parasitárias através da avaliação citopatológica do aspirado de linfonodo, foi efetuada a cada 6 meses. O protocolo terapêutico promoveu remissão total dos sinais clínicos em quinze animais, entretanto dois cães apresentaram recidiva do quadro clínico e três vieram a óbito. O efeito imunomodulador da anfoterina b, foi demonstrado pela soroconversão e normalização do proteinograma. O efeito leishmanicida da terapia foi comprovado pela ausência de parasitos no exame citopatológico de aspirado de linfonodo e na imunoistoquímica. O protocolo terapêutico promoveu aumentos significativos e progressivos da concentração sérica de uréia e creatinina, que foram restabelecidos após a utilização da anfoterina b. A concentração das enzimas hepáticas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase não apresentou alterações significativas durante a terapia.

NOGUEIRA, F.S. Clinical-Laboratory assessment of dogs naturally infected with visceral leishmaniosis, subjected to amphotericin B-based therapy.

ABSTRACT

The goal of this research was to experimentally assess the effects of the treatment of dogs infected by *Leishmania* spp., with amphotericin B associated to allopurinol and prednisone, evaluating renal and liver lesion and, mainly, the effectiveness of such protocol in controlling the disease by means of serology, parasite detection and clinical manifestation. Twenty adult, male and female, ELISA-seropositive dogs were therefore used. All dogs were treated with 16 administrations of amphotericin B, each dosed at 0.5 mg/kg and given in 3-day intervals, associated to allopurinol dosed at 10 mg/kg/12 hours for 18 months and prednisone dosed at 0,5 mg/kg/24 hours for 8 weeks. The experiment was carried out for 18 months and the variables analysed at distinct times. All animals were monitored in respect of renal and liver lesion through their serum concentrations of urea, creatinine, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in 7 moments: M0 – before treatment, M1 – 14 days, M2 – 28 days, M3 – 42 days, M4 – 56 days, M5 – 12 months and M6 – 18 months. All dogs were submitted to routine physical examination every 3 months and classified as asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic. Likewise, at the same moments proteinogram analysis was also carried out using serum concentration of total protein, albumin, globulin and albumin/globulin ratio. Antileishmania antibody detection and immunohistochemical analysis were carried out at 2 times – before the therapy and 18 months after its start. Every 6 months a cytopathological evaluation of the lymphoid aspirate was carried out in search of parasitic bodies. The therapeutic protocol promoted complete remission of clinical signals in fifteen animals, however two dogs showed relapse and three came to die. Amphotericin B immunomodulatory effect was demonstrated through seroconversion and proteinogram normalization. The leishmanicidal effect of the therapy was confirmed by the absence of parasite in the lymphoid aspirate cytopathological exam and in immunohistochemical analysis. The therapeutic protocol caused significant and progressive increases on the serum concentration of urea and creatinine, which were re-established after amphotericin B was administration. ALT and AST liver enzyme concentration did not show significant changes during the therapy.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	29
3.1. Objetivo Geral	29
3.2. Objetivos Específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Local.....	30
4.2. Animais.....	30
4.3. Protocolo Terapêutico.....	31
4.4. Variáveis Mensuradas.....	32
4.5. Momentos de Mensuração das Variáveis.....	33
4.6. Procedimento Experimental.....	34
4.7. Métodos Utilizados	34
4.7.1. Variáveis Bioquímicas.....	34
4.7.2. Punção Aspirativa de Linfonodo com Agulha Fina.....	35
4.7.3. Teste Imunoenzimático de Elisa.....	36
4.7.4. Técnica de Imunoistoquímica.....	36
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
6. RESULTADOS	37
6.1. Animais.....	37
6.2. Sinais Clínicos.....	37
6.3. Punção Aspirativa de Linfonodo com Agulha Fina.....	41
6.4. Teste Imunoenzimático (ELISA).....	44
6.5. Imunoistoquímica.....	44
6.6. Perfil Renal e Hepático.....	48
6.7. Proteinograma	50
7. DISCUSSÃO	52
8. CONCLUSÕES	65
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
10. APÊNDICE	97

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a Leishmaniose visceral (LV) vem merecendo atenção especial por parte dos clínicos veterinários e profissionais da saúde pública, tendo em vista ser uma antropozoonose e apresentar um aumento significativo do número de casos humanos e caninos.

Até 1998, não havia referência de casos autóctones de leishmaniose visceral no homem e em cães no Estado de São Paulo, sendo restrita somente às regiões Norte e Nordeste do país. No entanto, LUVIZOTTO et al., 1999 detectaram um foco da doença na região da alta noroeste do Estado de São Paulo, no município de Araçatuba, e posteriormente verificaram também a presença em municípios circunvizinhos.

O programa para o controle da leishmaniose visceral no Brasil, proposto pela Fundação Nacional de Saúde, visa o tratamento gratuito da população humana, o controle do reservatório doméstico através da eliminação de cães soropositivos, e o controle de vetores que é realizado através do uso de inseticidas (Ministério da Saúde, 2006).

O início deste programa remonta à década de 50 e teve como objetivo, quebrar os elos epidemiológicos da cadeia de transmissão da doença. No entanto, ainda não se dispunham de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos; a prevalência da doença humana e canina era menor; desconhecia-se a imunopatologia, bem como, a presença de outros reservatórios e, a doença apresentava-se restrita ao ambiente rural e silvestre (GONTIJO et al., 2004).

O enfoque dado para eutanásia dos cães, tem demonstrado ser ineficaz e despendioso (DYE, 1996; DIETZE, et al., 1997; COSTA, 2001; COURTENAY, et al., 2002).

Segundo COSTA (2001) a eliminação de cães soropositivos, dentre as medidas de controle da leishmaniose, é a que apresenta menor suporte técnico-científico, uma vez que existem vários pontos conflitantes nesta ação. Entre eles, o autor cita: a inexistência de correlação espacial entre a incidência cumulativa de leishmaniose humana com a soroprevalência dos cães acometidos; a grande velocidade do crescimento populacional da espécie canina; a baixa eficiência dos testes sorológicos utilizados em inquéritos

epidemiológicos; e a demonstração de que outros reservatórios podem servir de fontes de infecção da doença (COSTA, 2001).

DIETZE et al. (1997), avaliaram a importância do cão na manutenção do ciclo epidemiológico da doença e seu papel na transmissão da leishmaniose humana, adotando a eutanásia como medida de controle. Não foi observada diminuição significativa em análise estatística, quando tal medida foi adotada e concluíram que outros reservatórios podem contribuir na transmissão e na manutenção do ciclo do parasito, inclusive o próprio homem, sendo que medidas direcionadas somente na eliminação do cão, não trazem benefício algum.

Outros autores (DEANE, 1962; COSTA et al., 2000; OTERO et al., 2000) demonstraram a importância do homem soropositivo e com doença ativa na transmissão do agente etiológico, servindo de fonte de infecção para o vetor; embora existam poucos estudos em pacientes assintomáticos.

Assim, COSTA et al. (2000) pesquisaram o papel de indivíduos assintomáticos para LV como carreadores da doença em área endêmica. O ensaio de reação em cadeia pela polimerase (PCR) detectou DNA parasitário de *Leishmania chagasi* no sangue de 8 dos 108 indivíduos que coabitavam com pacientes diagnosticados positivos e tratados para a doença. Todos os indivíduos PCR positivos foram positivos para o teste intradérmico, porém apresentaram baixos níveis de anticorpos, demonstrando menor sensibilidade aos testes sorológicos utilizados no diagnóstico de infecções assintomáticas. Segundo estes autores, mesmo uma pequena proporção de indivíduos assintomáticos e considerados como fonte infectiva para vetores, contribuiriam substancialmente para a manutenção da doença em áreas endêmicas.

BRAGA et al. (1998) apontaram a baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos para explicar a não redução da incidência de calazar humano e canino. De acordo com os autores, a utilização da técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) utilizando eluato de papel de filtro apresenta uma sensibilidade muito baixa quando comparada com o método ELISA no soro.

Após 5 anos de atividades de controle do reservatório canino, utilizando a RIFI de eluato para detectar cães infectados, foi observado redução de 0,5 a

1% da prevalência da LV canina e não houve necessariamente uma interrupção de transmissão ao homem (OLIVEIRA LIMA et al., 1996).

Além da sensibilidade, o tempo decorrido entre a colheita de sangue e a eliminação do cão infectado, pode ser responsável pela manutenção da transmissão da infecção (BRAGA et al., 1998). Para tal assertiva duas estratégias de controle foram realizadas, uma com o diagnóstico pelo método ELISA e eliminação rápida do cão e outra baseada no programa realizado pelo Ministério da Saúde (MS) com diagnóstico pelo método RIFI de eluato e eliminação tardia. Os resultados mostraram, após 10 meses de estudo, diminuição da prevalência canina em 9% na área baseada no programa do MS e de 27% quando o diagnóstico foi realizado pelo ELISA, com eliminação rápida do reservatório. Outro dado interessante é que quando comparado os testes ELISA e RIFI nos dois grupos estudados, o teste ELISA apresentou maior sensibilidade.

De uma maneira prática, as medidas de controle da doença até agora implementadas foram incapazes de eliminar a transmissão e impedir a ocorrência de novas epidemias (Ministério da Saúde, 2006).

Ainda que o tratamento de cães com a doença seja realizado há muito tempo no Velho Mundo, no Brasil poucos estudos estão sendo conduzidos para verificar a sua eficácia.

A redução do parasitismo cutâneo, eliminação das manifestações clínicas, e principalmente, a recuperação da resposta imunocelular controladora da infecção, poderiam levar a uma redução da capacidade infectante dos flebotomíneos e, conseqüentemente a uma redução da prevalência nas espécies canina e humana, principalmente em áreas endêmicas (GRADONI et al., 1998; ALVAR et al., 1994, BANETH et al., 2001; RIBEIRO, et al., 2002).

As limitações com a terapia antimonial em cães, como a hipótese de indução de resistência parasitária, o alto custo, a toxicidade, e a proibição, no Brasil, do uso deste fármaco em animais, demonstram a necessidade de buscar alternativas terapêuticas mais acessíveis e de maior eficácia.

Assim, constituiu objetivo desta pesquisa avaliar experimentalmente os efeitos decorrentes do tratamento de cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.*, com a anfotericina b em associação ao alopurinol e

prednisona, avaliando em especial as alterações clínicas e laboratoriais, quanto à lesão hepática e renal, e principalmente à eficácia deste protocolo para o controle da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A leishmaniose foi “sugerida” pela primeira vez em 1903 por WILLIAM LEISHMAN e DONOVAN, que descreveram separada, mas simultaneamente, a ocorrência de parasitos em esfregaços de baço e fígado, de necrópsia de pacientes da Índia e Masdras. Inicialmente acreditavam ser uma forma involutiva de *Trypanosoma*, porém, ROSS em 1903 homenageando os descobridores, denominou o parasito de *Leishmania donovani*.

Nas Américas, o registro do primeiro caso da doença ocorreu em 1913, quando MIGONE, no Paraguai, observou a presença de “corpúsculos” de *Leishmania* em material de necrópsia de um paciente que havia trabalhado na construção da estrada de ferro São Paulo – Corumbá no Brasil (ALENCAR et al., 1991).

Atualmente, é considerada como sendo uma das seis endemias prioritárias no Mundo e está presente em países do Velho e Novo Mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

A leishmaniose visceral ou também conhecida como calazar (Kala-azar), febre dum-dum, febre de Assam, esplenomegalia tropical, doença negra, é uma doença infecciosa causada por protozoários flagelados, pertencentes à ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e ao Gênero *Leishmania* (DEANE e GRIMALDI, 1985).

Agrupados no complexo *Leishmania donovani*, atualmente são reconhecidas 3 espécies como agente etiológico da doença: *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* encontradas no Velho Mundo, e *Leishmania (Leishmania) chagasi* no Novo Mundo (ROSS, 1903).

A *Leishmania chagasi* apresenta ampla distribuição no Novo Mundo, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Paraguai, Venezuela, Guatemala, Guadalupe, Honduras, Martinica, México e El Salvador, sendo 90% dos casos concentrados no Brasil (BRANDÃO-FILHO e SHAW, 1994).

No Brasil, Carlos Chagas, suspeitou da doença já em 1911 às margens do rio Amazonas. Em 1934, Penna, demonstrou, na cidade de Salvador, a presença de parasitos semelhantes à *Leishmania donovani*, em preparados histológicos de fígado, quando pesquisava a febre amarela (CHAGAS, 1937).

Avaliando as características morfológicas do parasito *in vivo*, no hospedeiro vertebrado, e *in vitro* em cultura, assim como, o estudo da etiopatogenia dessa enfermidade, foi sugerido tratar-se de nova espécie do gênero *Leishmania*, que foi denominada de *Leishmania chagasi* em homenagem a Carlos Chagas (CHAGAS, 1937).

Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões do Brasil, exceto na região Sul. Hoje representa um grande potencial expensor, onde do total de 5500 municípios do Brasil, 1600 (29%) já estão acometidos pela doença (Ministério da Saúde, 2006).

No Estado de São Paulo, segundo o Grupo de Estudos em Leishmanioses, da Coordenadoria de Controle de Endemias, da Secretaria de Saúde, em 2007, observou-se a expansão da doença para outras regiões do Estado, destacando-se a transmissão da leishmaniose visceral canina nas regiões Metropolitanas de São Paulo e de São João da Boa Vista, e que 53,2% dos municípios encontram-se em situação de vulnerabilidade (Boletim Epidemiológico Paulista, 2007).

No Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* é o vetor implicado na disseminação e transmissão da doença. Recentemente, a *Lutzomyia cruzi* foi incriminada como vetor no Estado do Mato Grosso do Sul (Ministério da Saúde, 2006).

São insetos pequenos, medindo de 1 a 3 mm de comprimento, apresentam o corpo coberto de pêlos, e uma coloração castanho claro ou cor de palha. São facilmente reconhecidos pelo seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas. Adaptados a diversos ambientes, desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos de matéria orgânica e com baixa incidência luminosa. Com hábitos crepusculares, somente a fêmea alimenta-se de sangue para maturação dos ovos (DEANE e DEANE, 1955).

Conhecidos popularmente por mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros, são encontrados preferencialmente em áreas de florestas, matas secundárias, sopé das serras, margens dos rios, cavernas, abrigos de pequenos roedores e de outros animais (DEANE, 1962; MARZOCHI et al., 1985). No entanto, no ambiente doméstico, podem ser encontrados no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiros, canil, e também no intradomicílio.

A presença do parasito na natureza depende também de um reservatório, onde mamíferos pertencentes à Família Canidae, principalmente o cão doméstico, é apontado como a principal fonte de infecção para os flebotomíneos, quer pela alta prevalência da doença neste animal em área endêmica, quer pela grande quantidade de parasitas presentes na pele do mesmo. São implicados ainda na transmissão, em ambiente silvestre, o chacal, *Canis aureus*, o lobo, *Canis lupus*, e a raposa, *Vulpes vulpes* (BADARÓ e DUARTE, 1996).

Ainda podemos citar os roedores, edentados, marsupiais, procionídeos e primatas que também são considerados reservatórios da doença no ambiente silvestre (DEANE e DEANE, 1955).

Exista ou não acometimento clínico, o parasitismo cutâneo intenso, mantém o ciclo da doença no ambiente silvestre e domiciliar (MOLINEUZ e KILLICK-KENDRICK, 1987).

Na ausência de flebotomos, a doença pode ocorrer possivelmente pela presença de outros ectoparasitas de cães como *Ctenocephalides felis* e *Rhipicephalus sanguineus*, dada a freqüência e a intensidade com que ambos ocorrem nos animais (LINARDI e NAGEM, 1973).

A infecção dos hospedeiros invertebrados se dá quando estes, ao picarem um animal infectado ingerem juntamente com o sangue, formas amastigotas livres ou que estão dentro dos macrófagos. Estas amastigotas, num período de aproximadamente três dias após o repasto sanguíneo, sofrem sucessivas divisões e mudam progressivamente para formas promastigotas, também denominadas de nectomonas. As nectomonas se dirigem para a porção torácica do intestino médio e válvula cardíaca, se fixando nas microvilosidades das células epiteliais e se dividindo para dar origem, cinco dias após a infecção, às haptomonas. Posteriormente, algumas haptomonas invadem esôfago e faringe, sofrendo nova mudança para formas paramastigotas metacíclicas infectantes, que durante um novo repasto sanguíneo infectam outro hospedeiro vertebrado (BATES, 1994).

Em condições naturais, os flebotomos inoculam baixo número de paramastigotas metacíclicas, que é exposta à ação de enzimas produzidas pelo inseto, e que dependendo da imunocompetência individual, pode lançar

mão de mecanismos de controle da ação destas enzimas, facilitando assim sua instalação no hospedeiro (FERRER, 2002).

Após a inoculação do parasita na pele, ocorre uma resposta inflamatória local sendo inicialmente encontrados neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células “killer” (NK) e posteriormente linfócitos (DAY, 2004). As células NK desempenham papel fundamental na resistência da infecção pelo hospedeiro, pois ainda na pele, produzem rapidamente interferon gama (IFN- γ) e interleucina (IL-12), importantes indutores da produção de óxido nítrico pelos macrófagos. A produção de óxido nítrico e superóxido são os mecanismos mais eficientes de destruição parasitária.

O estabelecimento de uma resposta imune protetora ou não, exige também antígenos apropriados presentes nas células, a indução e a proliferação de células T e a ativação de macrófagos eficientes no controle da infecção. As subpopulações de células T que expressam a molécula de CD4 (células T auxiliares: T helper = Th) podem ser subdivididas em linhagens Th1 e Th2, e são distinguíveis pelas citocinas produzidas e pelos efeitos imunológicos que elas comandam. As células Th1 produzem principalmente as interleucinas 2 (IL-2) e 12 (IL-12), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- γ (IFN- γ) que pode iniciar a imunidade celular mediada e citotoxicidade. As células Th2 mediam a imunidade humoral, através da produção predominante das interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13, e apresenta comportamento antagonista às células Th1. O tipo de resposta imune produzida (Th₁ ou Th₂) é determinada principalmente pelas citocinas produzidas após o encontro dos macrófagos com o antígeno (NOLI,1999; PINELLI, et al.,1999; BELKAID, 2000; DAY, 2004).

De acordo com FERRER, (2002); a citocina IL – 4 é a mais importante a este respeito, pois ela regula a produção da IL – 12, e esta influencia na atuação das células NK.

O período de incubação ou pré-patente em animais naturalmente infectados pode variar de 3 meses a 7 anos, levando a diferentes apresentações clínicas da doença: forma aguda, sub-aguda, crônica e regressiva (ALENCAR, 1959; SLAPPENDEL e FERRER, 1990 GENARO, 1993).

Em áreas endêmicas, nem todos os animais que são infectados com *Leishmania* desenvolvem a enfermidade (BERRAHAL et al., 1996), no entanto

o percentual de cães resistentes à enfermidade não está totalmente estabelecido (FERRER, 1999).

A leishmaniose canina se caracteriza pela sua enorme variabilidade de sintomas clínicos e dos tipos de lesões apresentadas, devido basicamente a fatores individuais relacionados exclusivamente ao tipo de resposta imunológica desenvolvida, grau de infestação, tempo de evolução da enfermidade e aos órgãos afetados (FERRER, 1995). Assim, em alguns casos observamos freqüentemente diagnósticos falsos ou tardios dificultando assim seu controle em áreas endêmicas.

Apesar da grande variabilidade de sinais clínicos, existem animais infectados, que se apresentam aparentemente saudáveis e que são classificados como assintomáticos.

Em um estudo baseado no exame clínico de cães infectados por *Leishmania infantum* na ilha de Elba, Itália, MANCIANTI et al. (1988) classificaram clinicamente os animais em: assintomáticos – cães com ausência de sinais clínicos; oligossintomáticos – cães que apresentavam até 3 sinais clínicos da doença; e sintomáticos – cães que apresentavam todos ou mais de 3 sinais clínicos da enfermidade.

O aspecto clínico dos animais foi correlacionado com a infectividade para flebotomíneos em um estudo realizado na Colômbia, por TRAVI et al. (2001), com 20 cães sorologicamente positivos. Os animais foram submetidos a sucessivos xenodiagnósticos e acompanhados por PCR, cultivo, punção aspirativa com agulha fina (CAAF), e histopatológico de fragmentos de pele, retirados da região abdominal e face interna da pina. De acordo com as manifestações clínicas apresentadas, os animais foram classificados em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. A infecciosidade apresentada pelos cães foi avaliada por meio de porcentagem de flebótomos infectados e a intensidade da infecção determinada pelo número de promastigotas presentes no intestino do vetor. Os autores observaram diminuição significativa da infecciosidade e do encontro de parasitos na CAAF, PCR e cultivo dos animais que foram classificados como oligossintomáticos e assintomáticos. Com relação as amostras de pele coletadas, observou-se uma quantidade maior de parasitos nas amostras, quando estas foram coletadas da região da pina, indicando maior infecciosidade para o vetor.

Durante o curso da doença pode haver proliferação generalizada do parasito, colonizando órgãos linfóides e não linfóides (linfonodos, baço, medula óssea, fígado, rim, pâncreas, intestino, testículo, pulmão, olhos, articulação...) e indução de uma reação granulomatosa com número variável de formas amastigotas (BURACCO et al., 1988). Ocorre ainda proliferação de linfócitos B, histiócitos, macrófagos, plasmócitos, resultando em linfadenopatia generalizada e algumas vezes hepatoesplenomegalia (FERRER, 2002).

FEITOSA et al. (2000), estudando 215 cães soropositivos para leishmaniose visceral, observaram que 81% dos animais apresentaram linfadenopatias, sendo os linfonodos poplíteos os mais afetados.

A multiplicação de parasitos no fígado, especialmente nas células de Kupffer, pode causar além da hepatomegalia, hepatite difusa crônica com os seguintes sinais clínicos: vômitos, anorexia, perda de peso e icterícia (NOLI, 1999).

Além da proliferação parasitária e celular, ocorrerá uma produção de grande quantidade de imunocomplexos que irão se depositar na parede dos vasos e, posteriormente formação de processos inflamatórios degenerativos e necróticos em diversas regiões do organismo, constituindo o componente mais patogênico da enfermidade (LOPEZ et al., 1996; FERRER, 2002; NOLI, 1999).

As alterações dermatológicas estão presentes na maioria dos casos, sendo que os sinais mais comuns são: dermatite descamativa seca com ou sem alopecia; dermatite ulcerativa, com localização predominante em saliências ósseas e margem interna da pua; dermatite nodular; hiperqueratose nasal e digital; pêlos opacos, além de uma dificuldade de cicatrização (FONDATI et al., 2004).

Na Grécia, um estudo envolvendo 158 cães naturalmente infectados para leishmaniose visceral, as lesões dermatológicas mais freqüentemente observadas, foram dermatite esfoliativa (64,1%), acompanhada de dermatite piogranulomatosa e adenite sebácea em 50% dos casos (KOUTINAS et al., 2004).

FONDEVILA et al. (1997) e DAY (2004), estudando a resposta imune cutânea, observaram nas lesões alopecicas localizadas, aumento significativo de linfócitos T e aumento moderado de células de Langerhans e de queratinócitos, que podem influenciar positivamente no tipo de resposta

mediada por células, enquanto nas lesões nodulares granulomatosas, observaram grande quantidade de macrófagos parasitados e população reduzida de células imunocompetentes.

A onicogrifose é uma das características mais marcantes e pode ser considerado um sinal patognomônico por alguns autores (FERRER, 1999; SLAPENDELL, 1999; GENARO, 1993). Ocorre uma estimulação da matriz ungueal pela presença do parasito, embora não se possa descartar a possibilidade do crescimento resultar da apatia do animal doente, que reduz os movimentos, impedindo assim o desgaste natural. A frequência desta ocorrência varia de 47 a 64% dos casos (GENARO, 1993).

As alterações oculares como blefaroconjuntivite, ceratoconjuntivite seca ou não, uveíte, conjuntivite folicular e membranosa e panoftalmite, dentre outras, são decorrentes, principalmente, do depósito de imunocomplexos (FERRER, 1999). Os exames histopatológicos do trato uveal, revelam infiltrado linfohistioplasmocitário perivascular, além da observação de amastigotas. Nesses casos, a imunistoquímica demonstra também a participação das subpopulações de linfócitos CD4+ e CD8+ na patogênese das alterações oculares (ROZE, 1986).

Durante a evolução da enfermidade, as primeiras estruturas oculares que se alteram são a conjuntiva e a úvea, devido à sua maior vascularização. As uveítes granulomatosas associadas à presença de amastigotas nos macrófagos, ou linfoplasmocitárias de origem imunitária freqüentemente, são resistentes à terapia tópica e/ou sistêmica que evoluem para quadros de glaucomas e endoftalmite com conseqüente perda do globo ocular (KOUTINAS, 2004; ROZE, 1986).

Em um estudo retrospectivo no hospital da Universidad Autônoma de Barcelona entre 1993 -1998, observou-se uma prevalência de 24,4% das lesões oculares em animais soropositivos, sendo a uveíte anterior seguida de blefarite e da ceratoconjuntivite as mais freqüentes (PEÑA, et al., 2000).

A ceratoconjuntivite seca (KCS) em cães positivos para leishmaniose se explica pela deficiência da produção lacrimal, ocasionada pela presença de infiltrado inflamatório na glândula lacrimal, com obstrução dos ductos secretores, e pela diminuição dos reflexos secretórios. (ROZE, 1986).

Outro estudo avaliou a prevalência de afecções oculares e lesões da glândula lacrimal meibomiana e da membrana nictitante, mostrando também a presença de infiltrado inflamatório e de formas parasitárias (ROURA et al., 2005).

Outras manifestações oculares são referidas como a hiperemia conjuntival com quemose, hifema e afecções corneanas, como a ceratite superficial ou profunda (ROZE, 1986).

As lesões renais associadas a infecções por leishmaniose visceral nos cães, são decorrentes do depósito de imunocomplexos nos glomérulos e por ativação do complemento, causando geralmente a morte do animal (FERRER, 1999).

Em um estudo, na Itália, envolvendo 41 cães soropositivos para leishmaniose, foram realizadas eletroforeses de proteínas da urina e biópsia renal. As lesões descritas foram compatíveis com glomerulonefrite membranoproliferativa, membranosa, mesangial e focal. Na eletroforese de proteínas, a maioria dos animais (95,1%) apresentaram proteinúria não seletiva com presença de albumina, transferrina e IgG (ZATELLI et al., 2003). Segundo os autores, a avaliação quantitativa da proteína urinária e da taxa de creatinina sérica, e qualitativa por eletroforese, representam um papel importante no diagnóstico das lesões renais da leishmaniose.

A anorexia normalmente é vista em animais que já apresentam comprometimento renal, geralmente como resultado de uma azotemia crônica (KONTOS e KOUTINAS, 1993).

Além da diminuição do consumo de alimento, a competição hospedeiro-parasita por alguns nutrientes essenciais tal como o triptofano, associada à perda substancial de proteína urinária, pode contribuir para o emagrecimento e caquexia, em pelo menos 25% dos casos (KOUTINAS et al., 2004).

Além da perda de peso, encontramos em uma porcentagem alta dos cães infectados, uma atrofia muscular preferencialmente em músculos esqueléticos mastigatórios e temporal (FERRER, 1999; KOUTINAS et al., 2004; SLAPENDELL, 1990). VAMVAKIDIS et al. (2000) demonstrou que além da presença de parasitos, observa-se necrose e atrofia de fibra muscular, infiltrado mononuclear, vasculite neutrofílica, imunocomplexos e anticorpos séricos anti-miofibrilas. Segundo NOLI (1999), devido à atrofia muscular

particularmente da região da cabeça, os animais adquirem um aspecto mais envelhecido.

Sinais clínicos de diáteses hemorrágicas podem ser observados em animais com leishmaniose visceral, bem como petéquias dispersas pelo corpo, hematúria, e principalmente epistaxes (FERRER, 1999).

Com o objetivo claro de determinar a etiopatogenia das epistaxes, JUTTNER et. al. (2001), evidenciaram lesões ulcerativas e inflamatórias na mucosa nasal de animais soropositivos e com histórico recente de sangramento nasal.

Na análise laboratorial, em animais com comprometimento crônico renal e/ou hepático, podem ser observados quadros de azotemia, aumento de alanina aminotransferase e fosfatase alcalina (SLAPPENDEL e FERRER, 1990).

Ocorre também uma elevação das proteínas plasmáticas totais e na eletroforese sérica observa-se uma inversão da relação albumina/globulina, com aumento da fração gama, caracterizando uma hipergamaglobulinemia, com diminuição da albumina em alguns casos (ALENCAR, 1959; KEENAN et al., 1984). Segundo NOLI (1999), a hipoalbuminemia pode ser secundária ao comprometimento hepático, a proteinúria observada no paciente nefropata, além da desnutrição em animais com anorexia.

O diagnóstico da LVC representa um desafio real ao clínico veterinário, pela presença de animais assintomáticos, pela diversidade da sintomatologia clínica apresentada e pela dificuldade em se obter uma prova diagnóstica que ofereça 100% de sensibilidade e especificidade (FERRER, 1999; NOLI, 1999).

Segundo GRANDONI (2002), o diagnóstico da LVC é difícil, uma vez que mais de 50% dos cães com infecção estabelecida e comprovada são aparentemente assintomáticos. Quando os sinais clínicos estão presentes, são variáveis e mimetizam outras enfermidades.

A identificação do parasita pode ser realizada especificamente em material obtido de medula óssea, baço, fígado, linfonodo e pele, tanto pela histopatologia; esfregaços confeccionados por punção aspirativa (CAAF) e corados por Giemsa, Leishman, ou panótico rápido; como pela semeadura em meios de cultura e inoculação em animais de laboratório (GENARO et al., 1993; EVANS, 1990).

A visualização de formas amastigotas em esfregaços de CAAF de linfonodo ou medula óssea, representa o método de eleição para o diagnóstico de uma infecção estabelecida e disseminada na LVC, com 100% de especificidade. Entretanto, a sensibilidade do exame microscópico pode ser baixa, pois depende basicamente da coleta, do profissional e principalmente da amostra obtida, que pode apresentar baixa densidade populacional de parasitas (GRADONI, 2002).

Para FERRER (1999), a leishmaniose canina mimetiza outras doenças infecciosas e imunomediadas e, apesar do exame parasitológico de esfregaços de medula óssea e linfonodo ser rápido, fácil, de baixo custo, não traumático, e extremamente específico, possui baixa sensibilidade (60% para medula óssea e 30%, para linfonodo), necessitando do emprego de técnicas imunocitoquímicas, altamente sensíveis e específicas.

Na avaliação citopatológica do linfonodo, numa fase inicial da enfermidade, ocorre a predominância de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos reativos e escassa reação linfóide. Com a evolução do quadro e a intensa multiplicação parasitária, ocorrerá uma proliferação acentuada de linfócitos, presença de macrófagos íntegros e degenerados, e uma plasmocitose, observando-se plasmócitos repletos de imunoglobulinas que são denominados de corpúsculos de Russell ou células Mott (GRADONI, 2002).

No diagnóstico sorológico da LVC, anticorpos específicos devem circular no sangue e serem detectados após alguns meses do contato do cão com o protozoário (LAMOTHE, 2002). A grande produção de anticorpos causada pelo parasitismo faz dos métodos sorológicos uma ferramenta importante, seja pelo diagnóstico individual da infecção e da enfermidade ou na aplicação de inquéritos epidemiológicos. No entanto, estes métodos apresentam como desvantagens a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos que são prevalentes em algumas regiões (GENARO, 1993).

Diversas técnicas sorodiagnósticas são utilizadas na busca de anticorpos específicos da doença, principalmente a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio de ELISA, reação de fixação de complemento, teste de aglutinação direta e Western blotting (GRADONI, 2002).

No entanto todas as técnicas apresentam suas limitações, principalmente quanto à especificidade e sensibilidade (GENARO, 1991).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizada a partir da década de 60 (GENARO, 1993), é o “teste ouro” no diagnóstico sorológico da LVC, tanto no Brasil como em outros países, pois é o método recomendado pelo Manual Internacional de Testes Diagnósticos para Epizootias (OIE, 2000) e pelo Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral no Brasil (Ministério da Saúde, 2006). A especificidade desse teste é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com *Trypanossoma cruzi* e com a Leishmaniose Tegumentar (COSTA et al., 1991). A utilização de formas amastigotas de *Leishmania donovani* como antígeno, aumenta significativamente a sensibilidade, sem que o teste perca a especificidade, resultando num diagnóstico mais precoce frente a animais assintomáticos ou oligossintomáticos (FERNANDEZ-PEREZ et al., 1999). Este teste é amplamente utilizado em levantamentos epidemiológicos visando a detecção da LVC (COSTA et al., 1991; GENARO, 1991).

A sensibilidade da RIFI foi comparada com esfregaços de punção aspirativa de linfonodos. Segundo os autores, a sensibilidade para identificar animais soropositivos pelo método RIFI foi de 93,3% enquanto para a PAAF de linfonodo foi de 50%, com um total de 36,7% de animais considerados suspeitos (MOREIRA et al., 2007).

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) introduzido por HOMMEL et al. (1978) é uma metodologia que permite a realização de grande número de exames em curto espaço de tempo, apresentando alta sensibilidade, porém, se os antígenos utilizados não forem purificados, podem ocorrer reações cruzadas. Segundo GENARO, 1988; este teste tende a se consagrar como método de escolha para o diagnóstico sorológico da LVC.

Estudos em áreas endêmicas demonstraram maior sensibilidade deste método em relação a RIFI, quando utilizado soro e sangue total de cães, coletados em papel de filtro (EVANS et al., 1990).

PARANHOS-SILVA et al. (1996) num inquérito epidemiológico canino, envolvendo 148 amostras, 46 positivas e 102 negativas, compararam as técnicas de imunofluorescência indireta e o ensaio de ELISA quanto à sensibilidade e à especificidade, e os melhores resultados foram obtidos com o

ensaio de ELISA, que apresentou 78% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Nos últimos anos vêm sendo utilizado um método extremamente sensível e específico, a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que permite a identificação do parasita em uma variedade de materiais clínicos como: medula óssea, linfonodo, sangue periférico, biópsias de pele e na urina. Com essa técnica é possível identificar e ampliar seletivamente o DNA do cineplasto do parasita. Infelizmente, suas limitações para uso em inquéritos epidemiológicos se baseiam no custo alto, pouca disponibilidade de reagentes, de equipamentos e pouca adaptabilidade do método ao campo (GRADONI, 2002; NOLI, 1999).

QUINNELL et al. (2001), avaliaram a sensibilidade e a especificidade da técnica de PCR em 126 cães naturalmente infectados para LVC, comparando com o teste ELISA e com a resposta linfoproliferativa que ocorre durante a infecção. Segundo os autores, a sensibilidade da PCR em amostras positivas foi alta (98%), enquanto nas amostras colhidas logo após a infecção, a sensibilidade foi de somente 68%.

Com relação ao diagnóstico das alterações histopatológicas dos diferentes órgãos, nos poucos estudos existentes, foi verificada a associação entre a presença dos parasitas e um processo inflamatório granulomatoso caracterizado pela presença de células mononucleares (GEORGE et al., 1976, FERRER, 2002).

A técnica de imunistoquímica realizada em biópsias de pele, assim como em esfregaços e cortes histológicos de fígado, baço, linfonodo e medula óssea, aumentam sensivelmente a acurácia do diagnóstico, sendo constantemente utilizadas em animais que foram submetidos a diversos protocolos de tratamento, bem como para demonstrar a infecciosidade para flebotomíneos (FERRER et al., 1992).

A técnica de imunistoquímica foi correlacionada com o proteinograma de cães naturalmente infectados para LV, em amostras de pele retirada da região da pina. Formas parasitárias foram observadas em 18,3% dos animais, sendo que em 91,2% destes, a relação Alb/Glob se apresentou inferior a 0,6. Os animais que mostraram maior positividade na imunistoquímica foram os

que obtiveram menor relação Alb/Glob (0,4) demonstrando maior infecciosidade para flebotômíneos (RIBEIRO et al., 2004).

Todas as técnicas já mencionadas para o diagnóstico da LVC, variam quanto à sensibilidade, especificidade, praticidade e viabilidade. Assim, eleger uma única técnica a ser utilizada na rotina clínica, dependerá principalmente do objetivo a ser alcançado, ou seja, concluir diagnóstico de animais infectados, acompanhamento do desenvolvimento da enfermidade, e monitoramento dos animais submetidos ao tratamento.

Nos últimos anos, o tratamento canino tem sido realizado no Brasil e em outros países, como medida adicional para o controle da doença com implicações diretas na prevalência humana (ALVAR et al. 1994; RIBEIRO et al., 2002; MORITZ et al., 1999; BANETH et al., 2001; FERRER, et al., 1995).

Segundo GRADONI et al. (1998), o tratamento de cães assintomáticos e oligossintomáticos resulta em altas taxas de recuperação clínica, bem como impede o desenvolvimento da doença.

A eliminação do parasito nos órgãos e tecidos, especificamente na pele, tem sido considerada a melhor forma de controle da doença (VOULDOUKIS et al., 1996).

As drogas de escolha utilizadas freqüentemente para o tratamento da LVC, são: antimoniato de metil glucamina, anfotericina B e alopurinol. Vários outros compostos incluindo pentamidinas, aminosidinas, miltefosinas, metronidazol, e cetaconazol, estão sendo investigados como agentes anti-leishmania em cães, porém, sem apresentar ainda resultados satisfatórios (BANETH et al., 2001).

Antes de iniciar qualquer terapia, recomenda-se a realização de uma avaliação laboratorial do paciente por meio de hemograma, bioquímica sérica para perfil renal e hepático, exame de urina, e proteinograma para comparação e avaliação da eficácia do tratamento (NOLI, 1999).

Os derivados antimoniais são as drogas de escolha para o tratamento tanto da leishmaniose visceral humana como da canina há 66 anos e suas limitações incluem toxicidade, resistência parasitária, e alto custo (BANETH et al., 2002).

Os antimoniais bloqueiam o metabolismo parasitário através da inibição seletiva das enzimas leishmaniais que são necessárias para a atividade

glicolítica e da via oxidativa dos ácidos graxos, com conseqüente inibição da síntese de ATP e da replicação do seu DNA (TASSI, et al., 1994; BANETH, 2002; FERRER et al., 1995; NOLI, 1999).

De acordo com FERRER et al. (1995) e DENEROLLE (1996), o uso do antimoniato de n-metil glucamina por via subcutânea ou intravenosa durante 30 dias, associado ao uso do alopurinol como terapêutica de cães infectados, promoveu a recuperação clínica e imunológica, porém, em alguns animais não ocorreu a eliminação total do parasito.

No Brasil, IKEDA (2004) avaliou clínica e laboratorialmente, 14 animais infectados naturalmente para leishmaniose visceral e submetidos a diferentes protocolos de tratamento. O antimoniato de n-metil glucamina, quando associado ao alopurinol, promoveu melhora clínica, ausência de parasitos no linfonodo e medula óssea, com 85% dos animais negativos em “imprints” de baço e fígado ao final do estudo.

Recentemente, a utilização do antimoniato em cães no Brasil, foi proibida pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária por meio de um parecer técnico nº. 299/2004 da Advocacia Geral da União onde “fica proibido o uso do Antimoniato de N-metil Glucamina para o tratamento da Leishmaniose canina, quando o mesmo for de distribuição do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004b)”.

A anfotericina b foi primeiramente descrita, em 1956, por Gold e colaboradores, quando estudavam cepas de Streptomyces nodosus, no Vale do Rio Orenoco, na Venezuela (BENNETT, 1996). Sua estrutura química foi elucidada em 1970 e é classificada como sendo um antibiótico poliênico macrolídeo, que contém sete ligações duplas na posição 3-amino-3,6-didesoximanose ligada ao anel principal por ligação glicosídica (LAMOTHE, 2001).

Apresenta-se sob a forma de um pó amarelado, inodoro, insolúvel em água e estável em suspensão a 22° Celsius durante 24 horas, mesmo em presença de luz. Devem ser armazenados em geladeira, com temperatura que pode variar de 4° a 8° Celsius. Para aumentar sua hidrossolubilidade, associou-se a este antibiótico, o desoxicolato de sódio com o intuito de facilitar o uso desse fármaco quando administrado pela via parenteral (NETO 1985). Após a reconstituição do pó, com água estéril para injeção, a solução permanece

estável, quando protegida da luz, por 24 horas em temperatura ambiente, ou durante sete dias sob refrigeração (PLUMB, 1999).

No organismo, apresenta forte especificidade à membrana plasmática de fungos e protozoários, pela maior afinidade da droga ao ergosterol (o esteroide da membrana dos parasitas) do que ao colesterol, que é o principal esteroide encontrado na membrana plasmática de células animais (RANG et al., 2001).

Após ligar-se à membrana plasmática do parasita, forma um canal iônico que irá interferir na permeabilidade e nas funções de transporte celular, tendo como conseqüências a perda de íons intracelulares e de pequenas moléculas (BENNETT, 1996; HARVEY e CHAMPE, 1998; RANG et al., 2001). Com a saída destes íons, principalmente do potássio, há o comprometimento do seu metabolismo podendo levar ao seu rompimento e morte celular (BURDMANN et al., 1996; SCOTT et al., 2001).

A atividade imunomoduladora da anfotericina b sobre linfócitos, monócitos e leucócitos polimorfonucleares assim como sua resposta sobre os hospedeiros tem sido reconhecida e estudada (YAMAGUCHI et al., 1993).

Várias pesquisas demonstram que altas concentrações de anfotericina b inibem a função das células B, T e polimorfonucleares, que pode estar relacionado com a toxicidade pelo desoxicolato de sódio, presente em algumas preparações clínicas (MARMER et al., 1981; WALLS e KEY, 1982).

Um efeito imunoadjuvante sobre os linfócitos (NAIR e SCHWARTZ, 1982) e, um efeito imunoestimulante favorecem as funções dos macrófagos e polimorfonucleares na fagocitose, quimiotaxia e atividade microbicida (PERFECT et al., 1987; WOLF e MASSOF, 1990).

CHIA e Mc MANUS (1990) observaram que a anfotericina b pode estimular a produção de TNF α em macrófagos murinos, suprimindo a resposta humoral e auxiliando na resposta imunecelular.

Entretanto, ESCOBAR et al. (2001) não verificaram atividade imunomoduladora, e sugeriram que o efeito da droga estaria diretamente relacionado com a atividade microbicida.

Devido à sua baixa solubilidade em água, a anfotericina b não é bem absorvida quando administrada por via oral ou intramuscular (BEAM, 1992). A anfotericina b é organodepositária, permanecendo armazenada no fígado, no pulmão, no baço e nos rins, onde sofre metabolização lenta, permitindo

concentrações séricas fungistáticas ou fungicidas por até 48 horas (SMITH, 2000; NETO et al., 1985; FARIAS e GIUFFRIDA, 2002). É excretada muito lentamente pelos rins, sendo encontrados traços da droga por longos períodos, de semanas a dois meses após o término da sua administração (PLUMB, 1999; RANG et al., 2001).

Os possíveis efeitos adversos estão relacionados com a dose utilizada, onde podemos destacar principalmente a nefrotoxicidade causada pela intensa vasoconstrição renal, com posterior redução do fluxo sanguíneo (BRAGATIN e CUCÉ, 1983; MONTEIRO et al., 1993; TAVARES, 2002). Assim, níveis séricos aumentados de creatinina e uréia são normalmente observados durante a terapia.

SANTIN (2003) submetendo cães clinicamente sadios à terapia com anfotericina b, observou um aumento progressivo e estatisticamente significativo, das médias dos valores de uréia e da creatinina do soro destes animais.

A avaliação da concentração sérica de creatinina é freqüentemente interpretada como uma medida importante para verificar o ritmo de filtração glomerular, e a sua concentração plasmática esta inversamente proporcional ao ritmo de filtração glomerular (HENNEMANN et al., 1997).

A uréia é a principal forma de eliminação dos grupos amino derivados dos aminoácidos e responde por mais de 90% dos componentes nitrogenados da urina. Sua produção é realizada no fígado e então é transportada pelo sangue até os rins, onde é excretada em sua maior parte através da urina, no entanto pequena quantidade é degradada pelas bactérias no intestino (HARVEY e CHAMPE, 1998). A uréia é livremente filtrada pelos glomérulos e, sua retenção está relacionada à diminuição da filtração glomerular (MEYER e HARVEY, 1998).

BURDMANN et al., 1996 relatou insuficiência renal não oligúrica, logo após o início do uso desta droga, ocasionando quadro histopatológico de necrose tubular tóxica aguda, necrose e calcificação dos túbulos proximais e distais e, vacuolização inespecífica de pequenas e médias artérias e arteríolas.

Durante a terapia prolongada, alguns animais podem ainda apresentar náuseas, vômitos, diarreia, flebites localizadas, febres, tremores

(AMUSATEGUI et al., 1998) além de alterações hepáticas como icterícia (VALLADARES, et al., 1997; LAMOTHE, 1997).

A dose descrita em vários regimes terapêuticos foi desenvolvida empiricamente, baseando-se nos limites de toxicidade e em dados obtidos em trabalhos científicos (DAVIS, 1981). Para SCOTT et al. (2001), a dose de anfotericina b utilizada é 0,5mg / kg de peso vivo, diluída em solução de glicose a 5% e administrada em dias alternados.

Segundo RUBIN et al. (1989) as lesões glomerulares foram mais freqüentemente observadas quando a administração ocorreu em “bolus”, quando da comparação com a aplicação de forma lenta.

MALIK et al. (1996) demonstraram que a administração da anfotericina b na forma livre, por via subcutânea de forma lenta, diluída em solução de dextrose a 5%, reduziu a nefrotoxicidade sem interferir na eficácia.

Outros autores também verificaram a importância da diluição com solução de dextrose a 5% via intravenosa, para reduzir os efeitos colaterais (SLAPPENDEL e FERRER, 1990; NOLI, 1999; LAMOTHE, 2001)

A droga encapsulada em lipossomas surge como alternativa de tratamento, uma vez que o princípio ativo fica protegido de eliminação e/ou degradação rápida *in vivo*. A liberação lenta no interior da célula alvo proporciona a redução da concentração da droga quando comparada à forma livre e, o aumento da biodisponibilidade potencializa a ação e reduz os efeitos secundários indesejáveis (VALLADARES, et al., 2001).

Considerada durante muito tempo, como sendo a droga de segunda escolha no tratamento da LVH, nos últimos anos, este potente leishmanicida vem sendo amplamente utilizado nos casos resistentes à terapia com os antimoniais ou mesmo em pacientes imunocomprometidos HIV positivos. Isto é de extrema relevância, tendo em vista que também se observa na leishmaniose canina, uma significativa diminuição da resposta imune, o que confere à espécie canina modelo prático para avaliar a resposta terapêutica (OLIVA et al., 1995).

OLIVA et al. (1995) conduziu os primeiros estudos em cães, utilizando a anfotericina b associada a outras apresentações. A utilização da anfotericina b lipossomal em 13 cães naturalmente infectados para LV promoveu uma resposta clínica satisfatória, com diminuição da linfocitose e esplenomegalia e

melhora das lesões de pele, porém a cura parasitológica não foi conseguida, que foi atribuída à baixa dose utilizada ou a depressão grave das funções das células T, células estas, fundamentais para o sucesso da quimioterapia.

Atualmente, a anfotericina vem sendo utilizada no tratamento da LVC tanto na forma livre como em formulações lipídicas ou lipossomais (LAMOTHE, 2001).

A aplicação intravenosa rápida de anfotericina b, na dose de 0,5-0,8 mg/kg/ duas vezes por semana, foi utilizada em 30 cães soropositivos e sintomáticos para LV. Notou-se uma acentuada melhora clínica em 80% dos animais, sem observar recidivas do quadro clínico quando a terapia de manutenção foi suspensa. Houve diminuição significativa dos níveis de anticorpos séricos, com normalização da concentração de proteína total e aumento dos valores de albumina. Ainda que durante o tratamento observou aumentos na concentração sérica de creatinina, estes foram transitórios e voltaram aos parâmetros de normalidade quando a terapia foi suspensa (LAMOTHE, 1997).

Em outro estudo o fármaco foi associado com cetoanálogos e dexametasona e administrado em um animal assintomático com diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral, diminuição da relação albumina/globulina, e positividade da pele na imunocitoquímica. A droga foi administrada por via intravenosa na dose de 0,8 mg / kg de peso vivo / duas vezes por semana, durante 16 aplicações e diluída com solução glicosada a 5% com aplicações alternadas de dexametasona. Foi prescrito o uso de cetoanálogos para minimizar os possíveis efeitos nefrotóxicos. Ainda que alterações nas taxas de uréia e creatinina tenham sido verificadas, o animal manteve-se em bom estado de saúde com resultados negativos na imunocitoquímica após a terapia (VEADO et al., 2003).

A utilização de cetoanálogos tem sido proposta nos protocolos de tratamento das insuficiências renais, pois além de captar o nitrogênio da circulação, transforma-os em aminoácidos essenciais, fornecendo assim um suporte nutricional além de diminuir a concentração sérica de uréia e creatinina (BORGES, et al., 2002).

Um estudo conduzido em 67 animais, utilizando como protocolo doses sucessivas de anfotericina b (0,2 mg / kg no 1º dia; 0,3 mg no 2º dia; 0,4 mg no

3º e nos 27 dias posteriores) promoveu resposta clínica em 95% dos animais com desaparecimento dos sintomas, melhora do proteinograma, e diminuição dos títulos de anticorpos, com posterior recidiva do quadro em 17% dos animais (DELGADO, 2000).

Outras apresentações da anfotericina b estão sendo investigadas, como a emulsão lipídica utilizada por LAMOTHE (2001) onde a droga foi diluída em uma mistura contendo 80% de solução fisiológica e 20% de solução lipídica a 10%. Neste estudo, 19 cães infectados naturalmente e com sintomatologia típica da doença, foram submetidos ao protocolo terapêutico utilizando de 1 a 2,5 mg/kg de anfotericina b diluída na mistura, associada à infusão de solução salina e manitol e monitorados através de exame parasitológico, sorológico e molecular (PCR). Observou-se remissão dos sintomas em 89% dos animais, porém, 2 animais vieram a óbito durante o estudo. Efeitos colaterais consistiram de aumentos séricos transitórios de creatinina em todos os cães, com anorexia, vômitos e febre. A ausência de positividade na PCR de medula óssea foi evidenciada em 82,3% dos animais.

Outro fármaco utilizado em associação com antimoniais e anfotericina b no tratamento da LVC é o alopurinol, que é um análogo da purina e seu mecanismo de ação está relacionado com a síntese protéica. Segundo NOLI, (1999), as leishmanias não são capazes de sintetizar purinas, necessitando dos hospedeiros, portanto atua no RNA parasitário, incorporando-o e estimulando a síntese de proteínas anormais, exercendo um importante efeito leishmaniostático.

Utilizado na dose de 10 a 20 mg / kg / v.o. / bid, não apresenta efeitos colaterais, é de fácil administração, proporciona melhora clínica evidente e pode ser utilizado por um período de tempo indeterminado, com vantagens devido ao baixo custo e por não representar risco de resistência parasitária (BANETH, 2002; FERRER, et al., 1992; LAMOTHE, et al., 2001). Como desvantagens são citadas a interrupção do tratamento por parte do proprietário após a melhora clínica, a pouca efetividade quando utilizada de maneira isolada (LAMOTHE, 2001) e a possibilidade do desenvolvimento de urólitos de xantina (LING, et al., 1991).

A eficácia clínica e parasitológica do alopurinol foi avaliada em 5 cães sintomáticos, com títulos de anticorpos anti-leishmania, alterações no

proteínograma e positivos no cultivo. A infectividade dos animais para flebotômíneos foi verificada por meio de xenodiagnóstico. Após a terapia, foi observada melhora clínica em todos os animais, com diminuição significativa dos títulos sorológicos, restabelecimento do proteínograma, no entanto 4 cães ainda permaneceram positivos no cultivo. Ainda que os animais tenham permanecido positivos ao final do estudo, foi demonstrado através do xenodiagnóstico, que a terapia promoveu uma diminuição estatisticamente significativa da infectividade para flebotômíneos, representando sem dúvida, uma medida adicional no controle da doença, principalmente em áreas endêmicas (BANETH et al., 2001).

Segundo CAVALIERO et al. (1999) a utilização do alopurinol na dose de 10 mg / kg / bid promoveu uma melhora clínica em 9 dos 10 cães com sintomatologia e sorologia positiva. A recuperação clínica foi observada dentro de um período de 2 a 6 meses de terapia e nenhuma recaída foi observada em 20 meses, no entanto após o tratamento ser suspenso, 4 animais apresentaram recidiva.

Cães infectados e tratados com alopurinol na dose de 20 mg / kg / dia tiveram 78% de chance de sobrevida por mais de 4 anos, desde que uma insuficiência renal severa não existisse quando do início da terapia (SLAPPENDEL e TESKE, 1999).

A utilização de imunossuppressores, em especial os glicocorticóides, na terapia da leishmaniose tem sido amparada com objetivo de deprimir a imunidade humoral através da redução na produção de anticorpos e restringir os efeitos causados pelo depósito de imunocomplexos nos órgãos e tecidos (DENEROLLE, et al., 1996).

Na leishmaniose canina, a prednisolona ou prednisona foi utilizada na dose de 0,5 a 2 mg / kg / dia por um período que pode variar de 1 semana a 1 mês com redução progressiva da dose para evitar os riscos de uma insuficiência adrenocortical aguda (DENEROLLE, et al., 1996).

NOLI (1999) descreveu o uso de prednisolona na dose diária de 1 mg / kg em associação ao alopurinol quando está contraindicado o uso do antimoniato ou anfotericina b em cães com LV apresentando insuficiência renal.

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar experimentalmente o efeito terapêutico da anfotericina b associada ao alopurinol e a prednisona em cães naturalmente portadores de leishmaniose visceral, num período de 18 meses.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as manifestações clínicas antes e após o tratamento.
- Avaliação do perfil renal e hepático antes e durante a terapia, por meio da dosagem sérica de uréia, creatinina, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase.
- Análise do proteinograma.
- Pesquisa direta do parasito e avaliação citológica em linfonodo.
- Pesquisa de anticorpos pelo método ELISA.
- Avaliar o potencial de infectividade na biópsia de pele através da técnica de imunoistoquímica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local

O presente estudo foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (COBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Botucatu, e desenvolvido na cidade de Andradina – SP, que está localizada na região Noroeste do Estado de São Paulo, região endêmica para leishmaniose visceral canina.

As amostras de fragmento de pele para o exame de imunoistoquímica foram encaminhadas para o Laboratório de Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Para a pesquisa de anticorpos anti-leishmania, foi utilizado o Laboratório de Imunologia do Curso de Medicina Veterinária UNESP – Campus Araçatuba.

Os exames bioquímicos e a punção aspirativa com agulha fina de linfonodo foram realizados no laboratório da Clínica Veterinária Mundo Animal, que está localizada na rua São Paulo 1331, Centro – Andradina – SP.

4.2 Animais

Vinte cães adultos, machos e fêmeas, de raças variadas, com peso vivo variando entre 3 a 55 kg, apresentados à Clínica Veterinária, com manifestações clínicas compatíveis com leishmaniose visceral, foram incluídos neste estudo.

O diagnóstico sorológico foi realizado pela pesquisa de anticorpos anti-leishmania pelo teste imunoenzimático (ELISA).

Antes do início da terapia, os animais foram submetidos a exame físico rotineiro (Mc CURNIN e POFFENBAGER, 1991) e conforme as manifestações clínicas apresentadas foram classificados em oligossintomáticos e sintomáticos, de acordo com classificação preconizada por MANCIANTI et al. (1988).

Como critério de inclusão, todos os animais deveriam apresentar manifestações clínicas da doença, não possuir alterações séricas que pudessem indicar lesão renal e/ou hepática, e principalmente responsabilidade

e condição financeira por parte do proprietário, para a manutenção do tratamento.

Foram excluídos do estudo, os animais assintomáticos, soronegativos pelo teste ELISA, ou que apresentassem doenças concomitantes que pudessem interferir no tratamento ou na evolução do quadro clínico.

Foi realizado exame parasitológico de fezes pelo método de WILLIS, e os cães que apresentaram parasitoses intestinais foram tratados com medicação de uso veterinário à base de febendazole¹, na dose de 50mg / kg de peso / dia / durante 3 dias seguidos. Os animais que apresentavam ectoparasitas externos foram tratados com fipronil² tópico. Todos os cães foram imunizados contra cinomose³, hepatite, adenovírus tipo 2, parainfluenza, parvovirose, coronavirose, leptospirose, e raiva.

Por questões éticas e para evitar a possibilidade de re-infecções, e existência de fonte infectiva, os animais receberam um colar à base de deltametrina⁴, com reposição a cada 4 meses durante todo o estudo.

Os cães foram alimentados com rações comerciais balanceadas variadas⁵ e água *ad libidum*, e mantidos em domicílio durante todo o estudo.

Todos os proprietários foram orientados sobre os riscos do tratamento e da prevenção da doença, tendo seus cães incluídos no estudo após assinarem termo de consentimento livre e esclarecido.

Para a execução da experimentação, formou-se um grupo único, no qual cada animal foi o controle de si próprio.

4.3 Protocolo Terapêutico

Para todos os animais, foi utilizado o protocolo terapêutico com anfotericina b⁶ na dose de 0,5 mg / kg de peso vivo / a cada 3 dias, perfazendo 48 dias e, totalizando 16 sessões.

O fármaco foi diluído em solução glicosada⁷ a 5% na dose de 10ml / kg de peso vivo, e revestido com papel alumínio, para evitar a biodegradação

¹ Panacur Plus® comprimidos – Hoechst Roussel Vet.

² Front Line® Spot on - Merial

³ Duramune Max® – Fort Dodge Saúde Animal

⁴ Scalibor® - Intervet

⁵ Pedigree Champ® - Waltham; Premier®; Frolic® adulto

⁶ Fungizon® - Bristol Myers Squibb

decorrente da fotossensibilidade e, aplicada por via intravenosa lenta, durante 1 hora.

Foi adotada como terapia leishmaniosstática, o uso do alopurinol⁸ na dose de 10 mg / kg / de peso vivo / bid / v.o., durante 18 meses.

A prednisona⁹ foi utilizada na dose de 0,5 mg / kg / de peso vivo / sid / v.o., durante 2 meses, reduzindo-se a dose nas duas últimas semanas.

Em alguns animais, durante os momentos de observação, quando a concentração sérica de creatinina foi superior a 2,5 mg/dl, iniciou-se terapia adjuvante com cetanoálogo¹⁰ na dose de um tablete para cada 5 kg de peso vivo, até o restabelecimento dos parâmetros de normalidade.

4.4 Variáveis Mensuradas

- Bioquímicas:

- Proteínas totais (Pt)
- Albumina (Alb)
- Globulina (Glob)
- Relação Albumina – Globulina (Alb/Glob)
- Creatinina (Creat)
- Uréia (U)
- Alanina aminotransferase (ALT)
- Aspartato aminotransferase (AST).

- Pesquisa de anticorpos anti-leishmania pelo teste imunoenzimático (ELISA)

- Citopatologia Aspirativa de linfonodo (CAAF)

- Imunoistoquímica de biópsia de pele (IHQ)

- Avaliação de Sinais Clínicos.

⁷ Solução Glicosada® -

⁸ Alopurinol® - Apotex

⁹ Meticorten® - Schering Plough

¹⁰ Ketosteril ® - Frenesius Kabi

QUADRO 1 – Variáveis estudadas submetidas a escores

Variável	Descrição	Valor
Animais	classificação dos cães segundo sinais clínicos	1 – assintomáticos 2 – oligossintomáticos 3 – sintomáticos
Ensaio de ELISA	resultado do teste de ELISA	1 – negativo 2 – suspeito 3 - positivo
IHQ	resultado da imunoistoquímica	1 – negativo 2 - positivo
CAAF Linfonodo	resultado do exame citológico	1 – negativo 2 – suspeito 3 - positivo

4.5 Momento de Mensurações das Variáveis

O experimento foi realizado durante 18 meses, sendo que as variáveis foram analisadas em momentos diferentes.

Durante a aplicação da anfotericina b, foi avaliado o perfil renal e hepático por meio das variáveis bioquímicas (Creat. / U / ALT / AST) e estabelecido nos momentos: **M0** – antes do início do tratamento; **M1** – após 14 dias do início do tratamento; **M2** – após 28 dias; **M3** – após 42 dias; **M4** – após 56 dias; **M5** – 12 meses da aplicação e **M6** – decorridos 18 meses do início do protocolo.

O proteinograma que constou da mensuração de proteína total (Pt); albumina (Alb); globulina (Glob.), e relação albumina – globulina (Alb/Glob), foi realizado a cada 3 meses do início do tratamento. Da mesma forma, nos momentos supramencionados foi realizada a avaliação clínica dos cães, e estabelecido um escore conforme descrito no quadro 1.

A pesquisa de anticorpos anti-leishmania e a análise imunoistoquímica, foram realizadas em 2 momentos - antes do início da terapia e decorridos 18 meses do início do tratamento.

A avaliação citopatológica do aspirado de linfonodo, foi efetuada a cada 6 meses, utilizando um escore conforme descrito no quadro 1.

4.6 Procedimento Experimental

Após o diagnóstico sorológico positivo para leishmaniose visceral pelo teste imunoenzimático (ELISA) os animais foram novamente trazidos à Clínica Veterinária, e após serem contidos em uma mesa cirúrgica, procedeu-se à coleta das amostras.

Foi realizada antissepsia da região da veia cefálica, onde se procedeu à colheita de 5ml de sangue venoso que foi acondicionado em frascos sem anticoagulante para análise bioquímica.

Para a punção aspirativa de linfonodo com agulha fina (CAAF), foi determinado para todos os animais do grupo, o linfonodo poplíteo. Após tricotomia e antissepsia da região correspondente, foi realizada a aspiração de material do linfonodo com o auxílio de uma seringa de 10 ml e do citoaspirador de Valeri¹¹ e confeccionado esfregaço em lâminas.

Com o auxílio de uma tesoura curva de ponta fina, foi retirada uma amostra de 0,5 cm de comprimento de pele da borda interna da orelha, a qual foi acondicionada em frasco estéril contendo formol¹² tamponado a 10 %.

Após as coletas dos dados no momento M0, procedeu-se à aplicação do fármaco.

4.7 Métodos Utilizados

4.7.1 Variáveis Bioquímicas:

- Proteína Total (Pt), Albumina (ALB), Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), e Uréia (U) séricas: as dosagens foram realizadas pelo método colorimétrico¹³ por reação cinética.

¹¹ Citoaspirador de Valeri -

¹² Formol® - Química

¹³ Labtest®

- Creatinina (Creat): foi realizada pelo método colorimétrico por reação cinética¹⁴.
- Globulina: foi obtida pela diferença da concentração de albumina com a de proteína total.

Para análise estatística e discussão, foram utilizados valores de referências segundo KANEKO et al. (1997).

Quadro 2 – Valores de referência de bioquímica sérica

Uréia	10 – 28 mg/dL
Creatinina	0,5 – 1,5 mg/dL
Alanina aminotransferase	21 – 102 U/L
Aspartato aminotransferase	23 – 66 U/L
Proteínas Totais	5,4 – 7,1 g/dL
Albumina	2,6 – 3,3 g/dL
Globulina	2,7 - 4,4 g/dL

4.7.2 Punção Aspirativa com Agulha Fina (CAAF) de Linfonodo

Foi utilizada a punção aspirativa de linfonodo poplíteo com agulha fina conforme técnica descrita por COWELL e TYLER (1989), e realizado esfregaço em lâminas. Os esfregaços foram corados pelo Diff Quick ®¹⁵ e examinados posteriormente em microscópio óptico com objetiva de 100x, em imersão.

Os esfregaços foram examinados com o objetivo de identificar formas amastigotas no citoplasma dos macrófagos ou livres, como também avaliar os tipos celulares predominantes e, a reatividade das células do Sistema Fagocítico Mononuclear.

Os animais foram considerados positivos (quando foram visualizadas formas parasitárias em esfregaço), suspeitos (ausência de formas parasitárias, porém reação linfo-histioplasmocitária), e negativos (ausência de parasitos e/ou reação linfóide).

¹⁴ Creatinina cinética-CELM®

¹⁵ Hematocor ® - Biolog

4.7.3 Teste Imunoenzimático de Elisa

A pesquisa de anticorpos anti-leishmania no soro dos animais foi realizada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo a técnica descrita por LIMA et al., (2003).

Os animais foram considerados positivos (com altos títulos de anticorpos anti-leishmania), negativos (com baixos títulos de anticorpos) e suspeito (com valores de absorvância no limite de referência para a caracterização da doença).

4.7.4 Técnica de Imunoistoquímica

Os fragmentos de pele fixados em formol tamponado a 10% foram submetidos às técnicas rotineiras de inclusão em parafina e realizada a reação de imunoistoquímica visando detectar amastigotas imunomarcadas, segundo TAFURI et al., (1999).

5. Análise Estatística

Para as variáveis quantitativas foi utilizada a análise de medidas repetidas (ANOVA) na comparação das médias dos momentos. Para análise das proporções foi utilizado o teste do qui-quadrado e para análise dos escores foram utilizados os testes de Wilcoxon quando comparados dois momentos e de Friedman, quando foram comparados mais de dois momentos. O nível de significância utilizado foi de 5% (FISHER, et al., 1993).

6. RESULTADOS

6.1 Animais

As raças dos cães incluídos no estudo foram: Rottweiler (n: 3), Poodle (n: 4), SRD (n: 4), Teckel (n: 2), Dogue Alemão (n: 1), Cocker Spaniel (n: 1), Pinscher (n: 1), Doberman Pinscher (n: 2), e Retriever do Labrador (n: 2).

6.2 Sinais Clínicos

Os animais estudados foram submetidos a exame clínico e classificados de acordo com MANCIANTI et al. (1988) em: oligossintomáticos – cães que apresentavam até 3 sinais clínicos da doença; e sintomáticos – cães que apresentavam todos ou mais de 3 sinais clínicos da enfermidade.

QUADRO 3 - Número absoluto e percentual de cães oligossintomáticos e sintomáticos, de acordo com as manifestações clínicas observadas no início do projeto.

Classificação	n : absoluto	%
oligossintomáticos	8/20	40%
Sintomáticos	12/20	60%

Foram considerados oligossintomáticos 8 animais (40%) que apresentavam sintomatologia clínica (Quadro 4) da doença, como linfadenopatia (75%), alterações dermatológicas (50%), onicogrifose (25%), e emagrecimento (37,5%). As alterações dermatológicas descritas foram: dermatite, descamação e alopecia em saliências ósseas, preferencialmente na altura da articulação úmero-rádio-ulnar. A linfadenomegalia (Figura 2C) foi mais evidente nos linfonodos poplíteos e em cervicais superficiais.

QUADRO 4 – Manifestações clínicas detectadas no exame físico dos animais oligossintomáticos, antes do tratamento.

N:	Peso	Idade	Sexo	Manifestações Clínicas
1	20 kg	5 a	M	Linfoadenopatia e descamação em saliências ósseas.
3	48 kg	9 a	F	Linfoadenopatia e onicogribose.
6	5 kg	3 a	F	Linfoadenopatia, emagrecimento.
8	28 kg	5 a	M	Linfoadenopatia e emagrecimento.
12	18 kg	2 a	M	Linfoadenopatia e alopecia em saliências ósseas.
15	17 kg	3 a	M	Linfoadenopatia e onicogribose.
16	38 kg	3 a	F	Dermatite em saliências ósseas, emagrecimento.
20	55 kg	2 a	M	Descamação em região de pina e saliências ósseas.

Nos doze animais sintomáticos (60%), as manifestações clínicas (Quadro 5) foram: alterações dermatológicas (83,3%), linfoadenomegalia (75%), onicogribose (Figura 2A) - 58,3%, emagrecimento (Figura 2A) - 50%, atrofia de musculatura (33,33%), alterações oftalmológicas (16,66%), esplenomegalia (16,66%), alterações locomotoras (8,3%), episódios de hematoquesia (8,3%). As alterações dermatológicas observadas foram traduzidas por dermatite ulcerativa e necrótica na região de pina e saliências ósseas, descamação e rarefação pilosa generalizada (Figura 2D), dermatoses no plano nasal, e alopecia peri-ocular. A atrofia da musculatura esquelética (Figura 2A) foi preferencialmente na região da cabeça (fossa temporal e músculos mastigatórios). No comprometimento oftálmico, as lesões descritas foram de: uveíte (Figura 2B), edema corneal, e blefarite.

QUADRO 5 – Manifestações Clínicas detectadas no exame físico dos animais sintomáticos, antes do tratamento.

N:	Peso	Idade	Sexo	Manifestações Clínicas
2	42kg	8 a	F	Alopecia e descamação em região de pina, atrofia de musculatura temporal, claudicação de membros posteriores, onicogribose.
4	44 kg	7 a	M	Alopecia generalizada, descamação cutânea, linfoadenopatia, emagrecimento, atrofia de músculos mastigatórios e temporal, blefarite, esplenomegalia.

5	10 kg	7 a	F	Uveíte com hifema, dermatite em região de pina, dermatite em saliências ósseas, linfadenopatia.
7	9 kg	6 a	F	Uveíte, descamação e dermatite necrótica em região de pina, linfadenopatia, dermatite em plano nasal, onicogribose, esplenomegalia.
9	8 kg	4 a	M	Descamação cutânea generalizada, linfadenopatia, emagrecimento, ulcerações em saliências ósseas.
10	7 kg	2 a	M	Linfadenopatia, hematoquesia, atrofia de musculatura temporal, onicogribose.
11	47 kg	3 a	F	Epistaxe e palidez de mucosas, onicogribose, linfadenopatia.
13	5 kg	5 a	F	Dermatite em plano nasal, blefarite, descamação generalizada, onicogribose.
14	30 kg	5 a	F	Emagrecimento, onicogribose, descamação generalizada, alopecia localizada.
17	3 kg	1 a	M	Emagrecimento, dermatite em plano nasal, linfadenopatia.
18	40 kg	7 a	F	Alopecia generalizada, linfadenopatia, atrofia de musculatura temporal, emagrecimento.
19	8 kg	3 a	M	Descamação generalizada, onicogribose, emagrecimento, linfadenopatia.

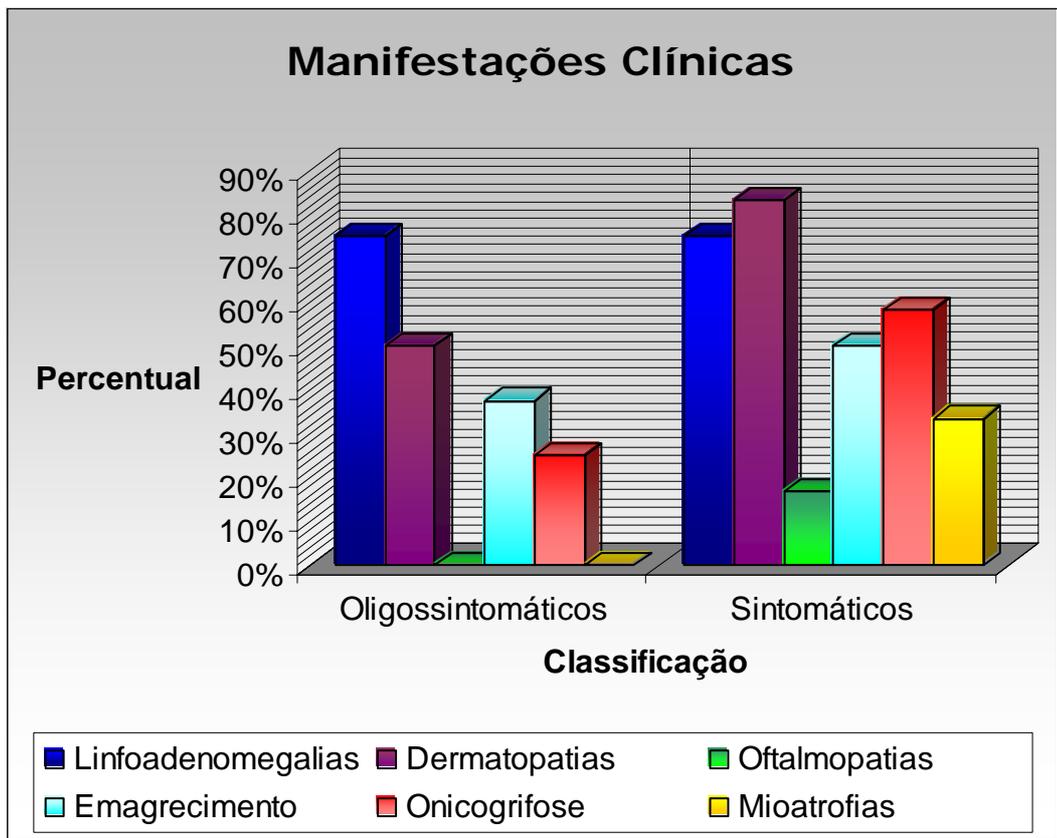


FIGURA 1 – Percentual de Manifestações Clínicas de animais oligossintomáticos e sintomáticos, antes do tratamento.



FIGURA 2 – Manifestações Clínicas da Leishmaniose Visceral Canina. (A) Emagrecimento; Onicogrifose (B) Blefarite, Alopecia peri-ocular, Uveíte, Edema Corneal; (C) Linfoanodopatia acentuada; (D) Descamação cutânea, Rarefação pilosa, Atrofia de musculatura esquelética temporal.

A diminuição dos sinais clínicos pôde ser observado com 3 meses do início do tratamento, independente dos animais serem sintomáticos ou oligossintomáticos, com a remissão completa de todos os animais sendo observada com 9 meses de tratamento, onde todos se mostraram assintomáticos (Figura 3B e 3D). No entanto, em 2 animais (n:18; n:10), considerados inicialmente sintomáticos, foi verificada recidiva do quadro após 18 meses do protocolo. Durante o estudo, 3 animais (n:2; n:5; n:7) vieram a óbito, verificado após 9 meses de terapia.



FIGURA 3 – Manifestações Clínicas pré e pós-terapia. A) Atrofia de musculatura esquelética temporal, emagrecimento, e alopecia peri-ocular antes do início da terapia; (B) Remissão dos sinais clínicos 18 meses do início da terapia; (C) Descamação cutânea generalizada e rarefação pilosa; (D) Remissão dos sinais clínicos 18 meses do início da terapia.

6.3 Punção Aspirativa com Agulha Fina (CAAF) de Linfonodo

Na avaliação da punção aspirativa de linfonodo poplíteo com agulha fina (CAAF) e corado por Diff Quick®, foram identificadas formas parasitárias livres e/ou no interior de macrófagos (Figura 4C) em 75% dos animais (15/20) antes do início da terapia. A análise citológica mostrou reação linfocitária intensa (FIGURA 4B) com predomínio de linfoblastos, plasmócitos, macrófagos e corpúsculos de Russel. A ausência de parasitos, porém com alteração na celularidade, foi evidente em 15% das amostras - 3/20 (cães n:1, n:3, e n:8) e estes foram considerados suspeitos, enquanto que em 2 animais (n:15, n:16) ,

ainda que sorologicamente positivos, não foram evidenciadas amastigotas típicas, nem reação linfoplasmocitária. Dos cães positivos no exame citológico, 80% eram sintomáticos em M0, e mesmo nos 20% dos oligossintomáticos, a principal manifestação clínica observada foi linfadenomegalia.

Nos momentos avaliados, houve uma redução na identificação de formas amastigotas no exame citológico, que foi significativa à análise estatística aos 12 meses do tratamento, não evidenciando o parasito, e que se estendeu até os 18 meses. Somente em um animal (cão n:10), 9 meses após o início da terapia, foi detectado o parasito no esfregaço de linfonodo, ao mesmo tempo em que houve recidiva dos sinais clínicos. Os dois animais (cães n:18; n:19) que foram considerados suspeitos no final do período de observação(11,76%), um deles apresentou recidiva do quadro clínico e o outro era clinicamente assintomático.

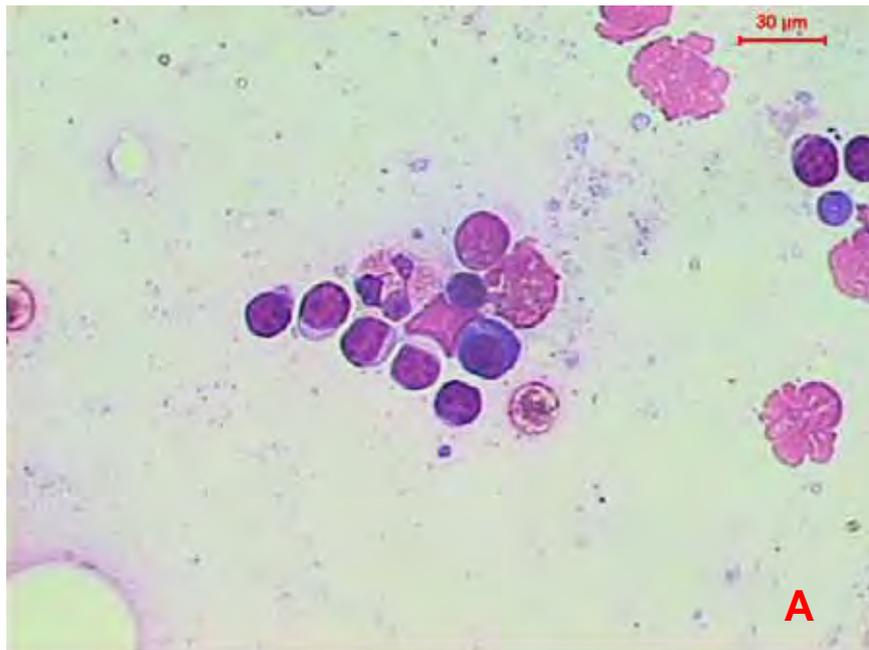


FIGURA 4A - Ausência de formas parasitárias e/ou reação linfóide

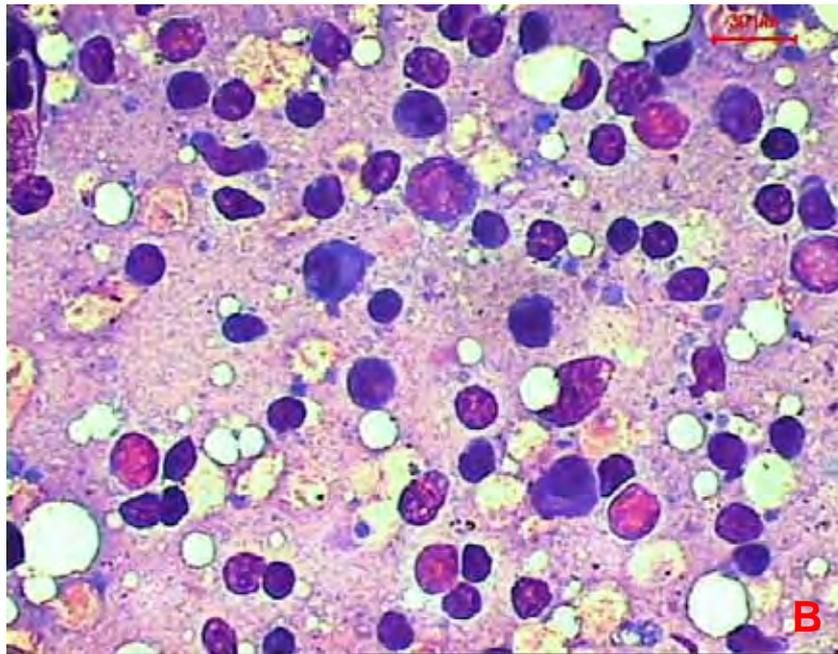


FIGURA 4B - Reação Linfohistioplasmocitária

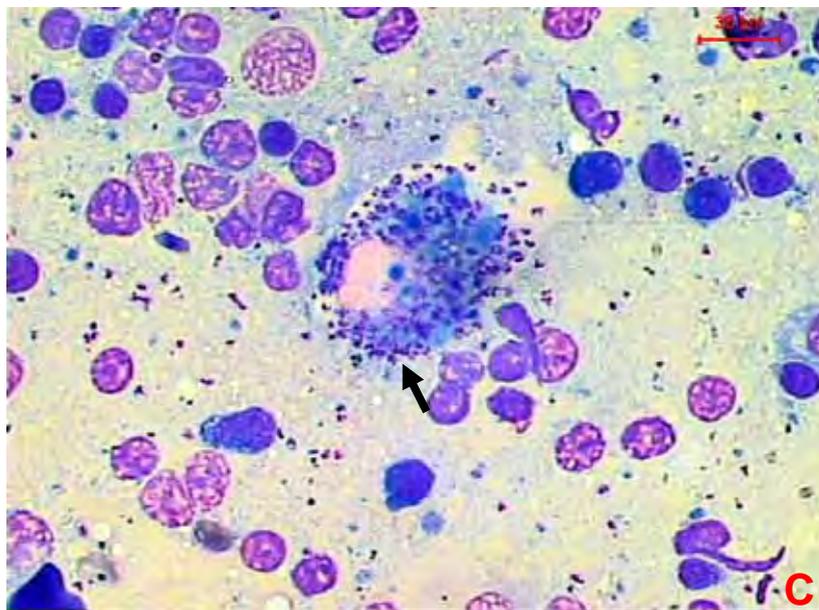


FIGURA 4C - Formas amastigotas livres e no interior de macrófago

FIGURAS 4 – A, B, C – Caracterização citológica da punção aspirativa de linfonodo com agulha fina, coradas pelo método Diff Quick.

6.4 Teste Imunoenzimático (ELISA)

Como o critério de inclusão dos animais participantes do estudo foi baseado no diagnóstico sorológico, inicialmente todos os cães eram soropositivos. Decorridos 18 meses da terapia, 64,70% (11/17) dos animais não apresentaram título de anticorpos anti-leishmania detectados pelo teste e foram considerados negativos, porém 23,52% (4/17) – cães (n:10; n:18; n:19; n:20) - ainda permaneceram positivos, e 11,76% (2/17) – cães (n:15; n:16) - considerados suspeitos. Deve-se ressaltar que três animais foram à óbito antes do final do estudo. Dos animais soropositivos aos 18 meses, dois animais (cães n:10; n:18), também apresentaram recidiva do quadro e resultado positivo no exame citológico de linfonodo.

6.5 Imunoistoquímica

Na avaliação imunoistoquímica de biópsia de pele da pua, foi observado antes do tratamento, positividade em 40% (8/20) das amostras dos cães, e quando correlacionada com os sinais clínicos observou-se que destes, 87,5% eram sintomáticos.

Após o tratamento, um animal (cão n:10), apresentou imunoistoquímica positiva (FIGURA 5), identificando formas amastigotas imunomarcadas na pele. Este animal apresentou recidiva clínica da doença após 18 meses, além de positividade no linfonodo e na sorologia.

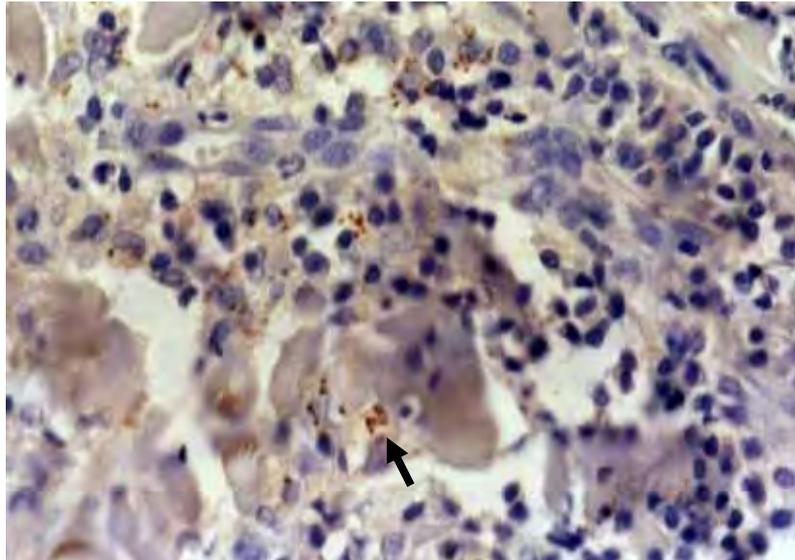


FIGURA 5 – Reação de imunoistoquímica positiva para *Leishmania* sp. na biópsia de pele, coletada da região da pina (400x)

TABELA 1 – Mediana, 1^o e 3^o quartil, entre colchetes, referentes aos escores das variáveis segundo o momento.

Momento	Elisa	CAAF linfonodo	IHQ	Manifestações clínicas
M0	3,0[3,0;3,0]A	3,0[2,5;3,0]B	1,0[1,0;2,0]	3,0[2,0;3,0]A
M1	1,0[1,0;2,2]B	2,0[1,5;3,0]C	1,0[1,0;1,0]	2,0[2,0;3,0]B
M2		1,0[1,0;2,0]A		1,0[1,0;2,0]C
M3		1,0[1,0;1,0]A		1,0[1,0;1,5]C
M4				1,0[1,0;1,0]C
M5				1,0[1,0;1,0]C
M6				1,0[1,0;1,0]C

P<0,001 P<0,001 P=0,06
 Medianas seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

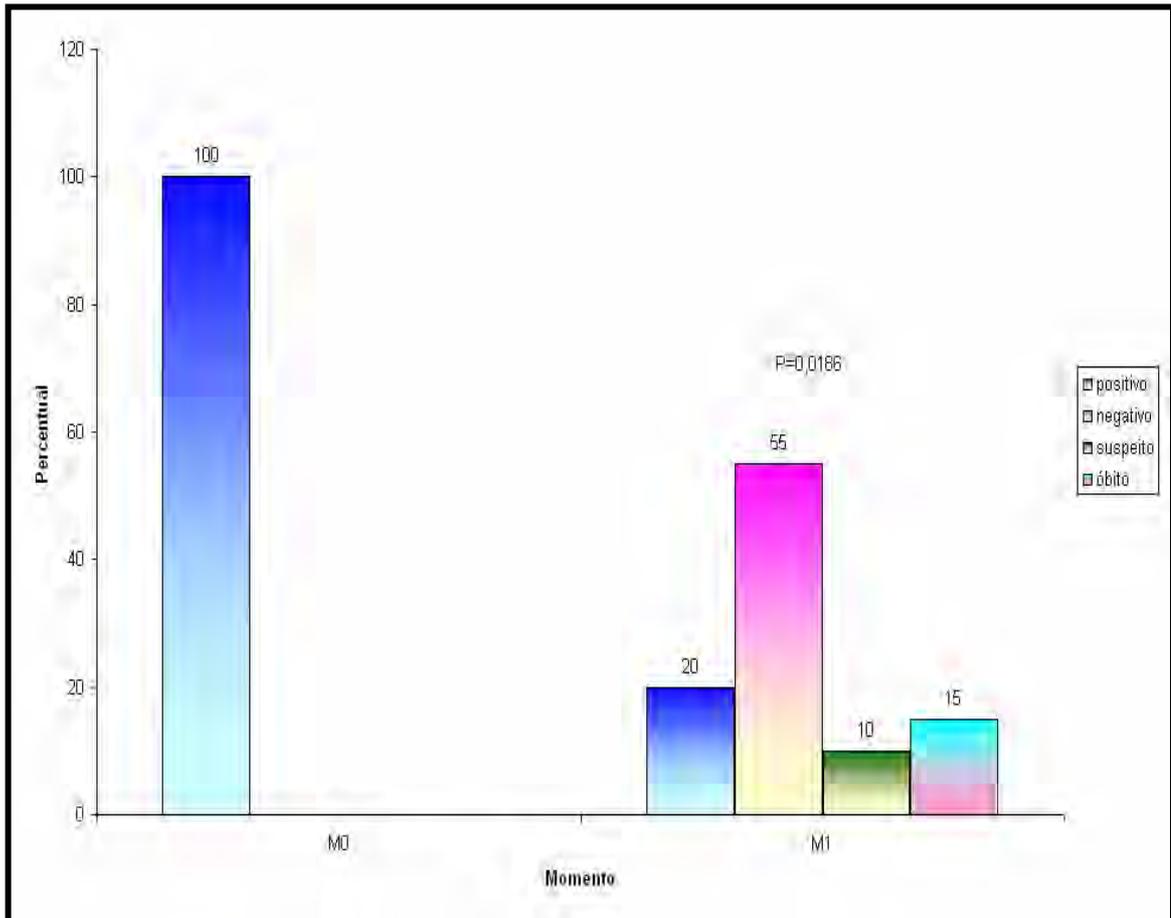


FIGURA 6 – Percentual de resultado positivo, negativo, e suspeito do teste ELISA antes e após a terapia. A porcentagem de animais que foram a óbito também está incluída.

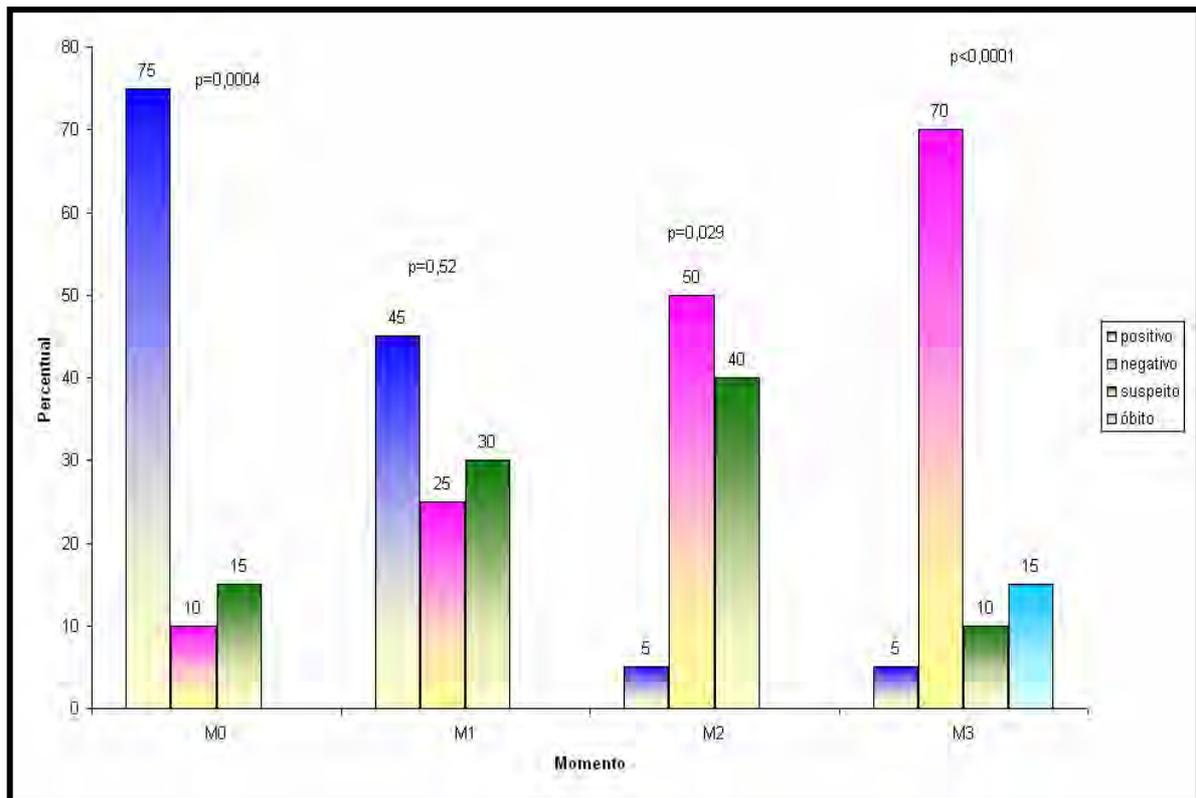


FIGURA 7 – Percentual de resultado positivo, negativo, e suspeito da Punção Aspirativa com agulha fina antes e após a terapia.

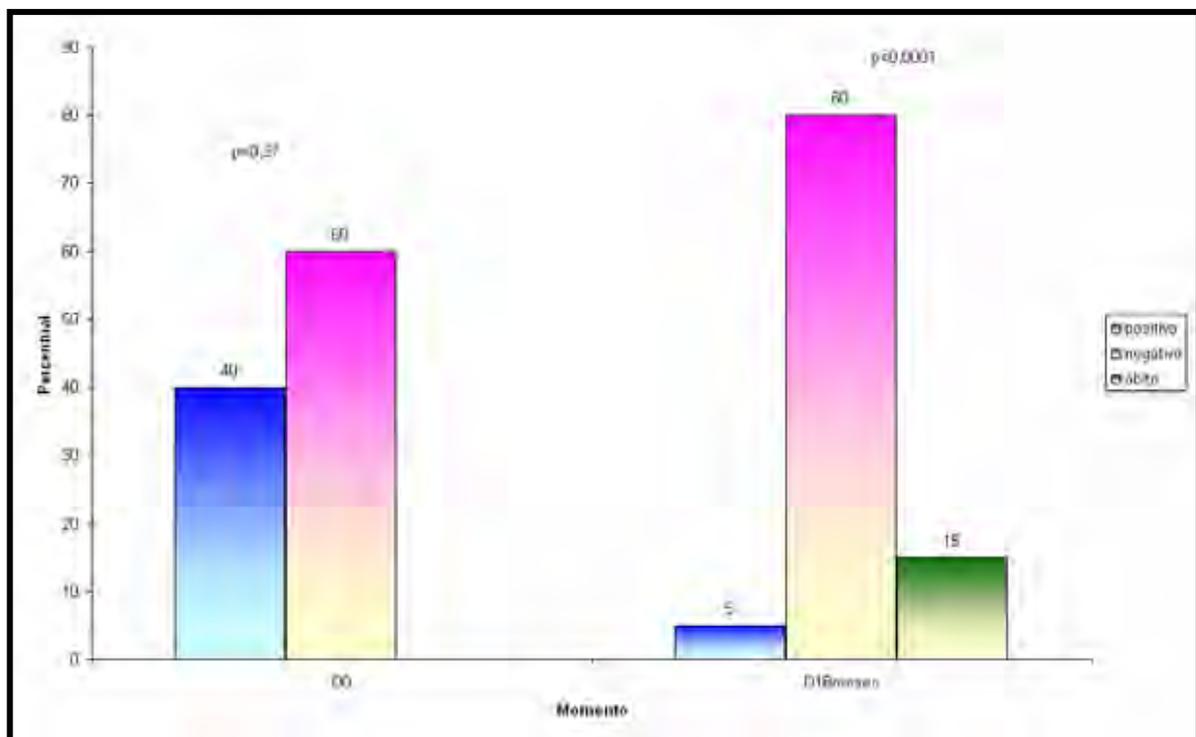


FIGURA 8 – Percentual de resultado positivo e negativo da reação de imunohistoquímica antes e após a terapia.

6.6 Perfil Renal e Hepático

Os valores médios e desvio padrão das variáveis creatinina, uréia, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, estão expressos na tabela 2. Em M0 todos os animais apresentaram valores dentro dos limites de normalidade, como critério de inclusão. Durante os momentos de observação houve aumento progressivo dos níveis de creatinina e uréia, estatisticamente significativos, com pico máximo em M3 ($2,44 \pm 0,74$ e $128,6 \pm 44,3$ respectivamente). Em M4 esses valores restabeleceram-se próximos aos valores de M1 para creatinina ($1,89 \pm 0,38$) e M2 para uréia ($112,1 \pm 38,1$). Após 12 meses do início do tratamento (M5), foi verificado valores nos limites de normalidade para creatinina ($1,25 \pm 0,20$) e uréia ($52,1 \pm 12,3$), que se mantiveram até 18 meses pós-tratamento. Os valores máximos foram verificados (Creat: 4,5 e U: 221) no cão (n:7) em M3 (Quadro 6 e 7).

Com relação à função hepática, foram observados aumentos estatisticamente significativos progressivos de ALT e AST durante os momentos M0 à M5, porém dentro dos valores normais, com restabelecimento dos valores basais no momento M6. Houve um aumento discreto de AST no momento M3 ($67,6 \pm 30,5$).

TABELA 2 – Valores médios e desvio padrão referente às variáveis séricas Creatinina (mg/dL), Uréia (mg/dL), Alanina aminotransferase (UI/L) e Asparatato aminotransferase (UI/L) segundo momento.

Momento	Variável			
	Creatinina	Uréia	AST	ALT
M0	1,07±0,30D	33,0±9,9D	25,0±7,9C	26,5±7,4C
M1	1,83±0,24B	79,6±25,6C	48,9±17,1B	51,9±22,7AB
M2	2,32±0,52 ^a	105,2±35,1B	64,1±23,2AB	68,0±28,1A
M3	2,44±0,74 ^a	128,6±44,3A	67,6±30,5A	64,5±29,6A
M4	1,89±0,38B	112,1±38,1AB	51,4±19,5B	55,6±24,7AB
M5	1,25±0,20C	52,1±12,3D	49,3±22,1B	45,1±21,7BC
M6	1,09±0,26C	40,8±9,4D	38,8±12,1C	33,4±10,2C

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

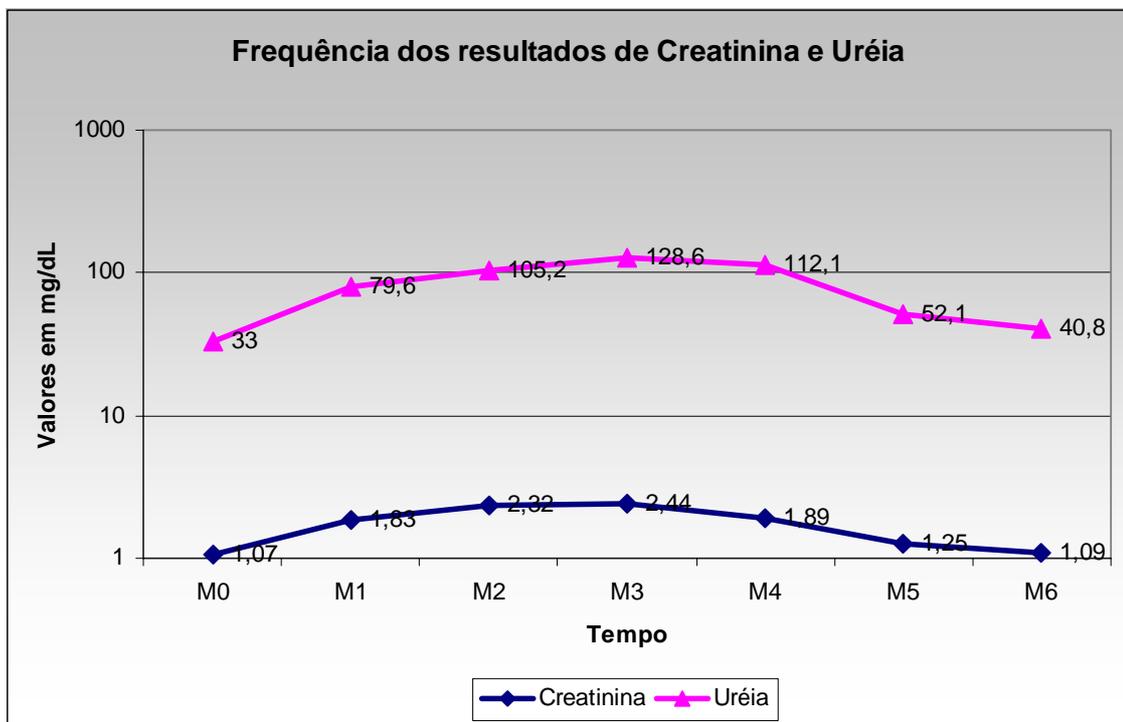


FIGURA 9 – Valores médios e desvio-padrão dos níveis séricos de Creatinina e Uréia, durante os momentos de observação.

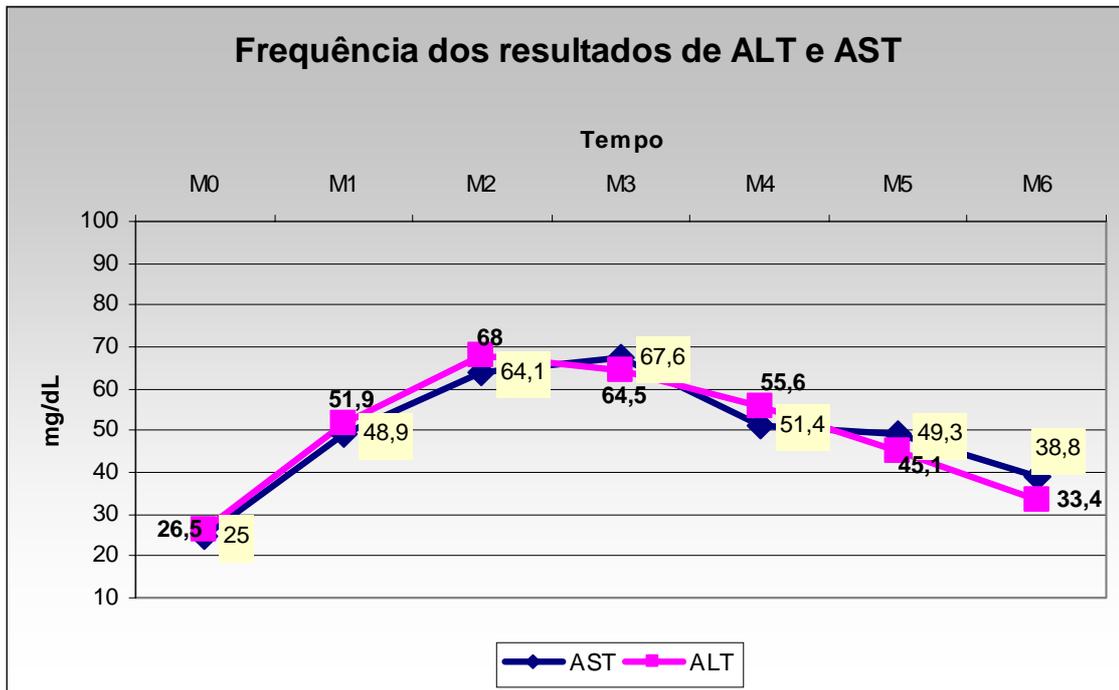


FIGURA 10. Valores médios e desvio-padrão dos níveis séricos de Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT), durante os momentos de observação.

6.7 Proteinograma

Na avaliação do proteinograma, todos os animais mostraram valores acima dos limites padrões de proteína total antes da terapia ($9,5 \pm 1,6$), com redução progressiva nos momentos subsequentes. Os valores foram restabelecidos à normalidade em M4 ($7,1 \pm 0,7$), quando mantiveram-se constantes até M6 (18 meses).

Com relação à albumina, nos momentos analisados, não foi observado diminuição ou aumento significativo à análise estatística. Os níveis de globulina estiveram acima dos de referência antes da terapia ($6,3 \pm 1,6$), com diminuição progressiva durante os momentos, e estes correlacionados com a diminuição dos valores de proteína total.

A relação albumina/globulina apresentou diminuição significativa à análise estatística nos valores médios das amostras antes da terapia ($0,5 \pm 0,2$),

havendo aumento constante das médias durante os momentos subseqüentes ao tratamento.

TABELA 3 – Média e desvio-padrão referentes às variáveis proteínas totais (g/dL), albumina (g/dL), globulina (g/dL) e relação albumina/globulina segundo momento.

Momento	Variável			
	Proteínas Totais	Albumina	Globulina	Relação globulina/albumina
M0	9,5±1,6A	3,2±0,6A	6,3±1,6A	0,5±0,2C
M1	8,8±1,6A	3,3±0,5A	5,6±1,5A	0,6±0,2C
M2	8,0±1,2B	3,2±0,4A	4,9±1,2B	0,7±0,2BC
M3	7,6±0,9BC	3,2±0,4A	4,5±0,9BC	0,7±0,2AB
M4	7,1±0,7C	3,2±0,4A	3,9±0,6C	0,8±0,1A
M5	7,0±0,7C	3,1±0,3A	3,9±0,8C	0,8±0,2AB
M6	7,1±0,9C	3,2±0,3A	3,8±0,9C	0,8±0,2A

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

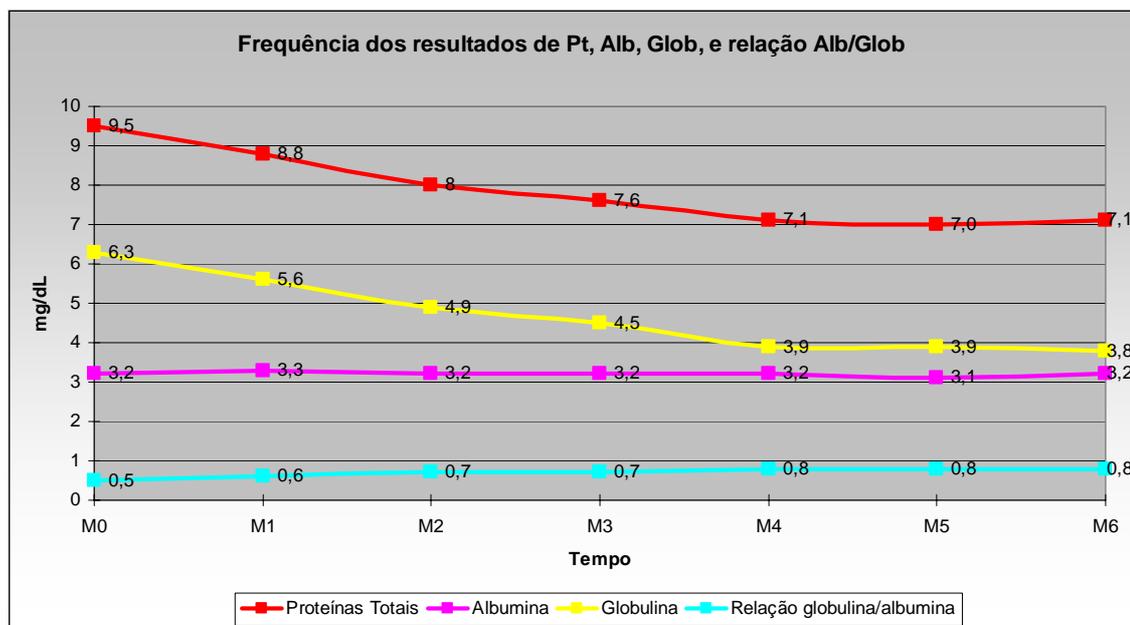


FIGURA 11 – Valores médios e desvio-padrão dos níveis séricos de proteína total, albumina, globulina e relação Alb/Glob, nos momentos de observação.

7. DISCUSSÃO

Durante décadas, o controle do reservatório canino através da eutanásia dos animais soropositivos para leishmaniose visceral, vem sendo realizado e atualmente bastante discutido. Resultados insignificantes na redução da prevalência da leishmaniose canina e humana são descritos (DYE, C. 1996; DIETZE et al., 1997; BRAGA et al., 1998; COSTA, 2001; COURTENAY et al., 2002). De acordo com a maioria dos autores, a dificuldade dos métodos diagnósticos em detectar a doença em animais assintomáticos, a presença de outros reservatórios, a demora entre a coleta e a eliminação dos cães doentes, bem como a recusa da população a aceitar esta última medida, são apontados como fatores principais para o insucesso do controle da doença. Por outro lado, verifica-se também que as medidas mesmo quando bem utilizadas, são autolimitantes, não reduzindo a prevalência canina dado à alta taxa de reposição desta população (CAMARGO-NEVES, 2004).

Sem dúvida a recusa por parte dos proprietários em entregar o animal, que muitas vezes se apresenta de forma assintomática, para realizar eutanásia, e que exerce um papel social e afetivo dentro das famílias, faz com que a OMS (Organização Mundial de Saúde) reconheça as limitações desta medida. Assim, nos países subdesenvolvidos a eutanásia se reserva para animais sintomáticos, com recidivas, e quando o proprietário faz a opção por esta medida.

A alta prevalência da doença na espécie canina em áreas endêmicas, bem como o intenso parasitismo cutâneo verificado nestes animais (BADARÓ e DUARTE, 1996), torna-os o alvo principal para o controle da doença.

O tratamento da leishmaniose visceral canina vem sendo realizado no Velho Mundo há mais de 50 anos, como forma curativa e como medida preventiva da doença. No Brasil, o método de controle terapêutico é visto ainda com ceticismo pelos órgãos de Saúde Pública, amparado na possibilidade de resistência parasitária, recidiva do quadro clínico de alguns animais, e pela alta prevalência na população humana.

O antimoniato que é considerado como droga de eleição, para o tratamento da LVC e LVH, nos países europeus, fica proibido no Brasil, conforme nota técnica do Conselho Federal de Medicina Veterinária através de

um parecer de nº. 299/2004 da Advocacia Geral da União onde “fica proibido o uso do Antimoniato de N-metil Glucamina para o tratamento da Leishmaniose canina, quando o mesmo for de distribuição do Ministério da Saúde. De acordo com a nota técnica, destacamos o fato de que o desvio do medicamento para outros fins pode configurar crime contra a Administração Pública, cujas penas são relativamente altas, (podendo chegar a 12 anos de reclusão), e portanto constituindo em prática ilícita por parte do profissional que desvia o medicamento ou que indica o tratamento canino (BRASIL, 2004b). Lembramos o fato de que, recentemente foi lançado no mercado europeu, o antimoniato específico para cães (Glucantime ®) pelo laboratório – MERIAL, com o objetivo específico de diminuir a prevalência da doença na população canina.

No entanto não há relatos na literatura comprovando a resistência parasitária aos antimoniais ou mesmo da anfotericina b, em cães submetidos ao tratamento.

No Brasil, a utilização da anfotericina b para o tratamento de pacientes humanos, não é rotineira, sendo reservada para pacientes com resistência aos antimoniais, devido particularmente a sua nefrotoxicidade. Várias pesquisas no Velho Mundo (LAMOTHE, 1999; DELGADO, 2000; LAMOTHE, 2001; OLIVA et al., 1995) e no Brasil (VEADO et al., 2003), têm demonstrado sua eficácia na população canina.

Embora MANCIANTI et al., (1988) classifiquem os animais clinicamente em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, no presente estudo, baseado no critério de inclusão, não foram utilizados inicialmente, animais assintomáticos. A sintomatologia clínica apresentada, tanto nos animais classificados de oligossintomáticos (40%) quanto os sintomáticos (60%), foram preferencialmente as linfadenopatias; dermatopatias, que se traduziram por dermatite ulcerativa e necrótica na região de pina e saliências ósseas, descamação e rarefação pilosa generalizada, dermatoses no plano nasal, alopecia peri-ocular, e onicogribose; emagrecimento; atrofia da musculatura esquelética, preferencialmente na região da cabeça (fossa temporal e músculos mastigatórios); e oftalmopatias (uveíte, edema corneal, e blefarite).

A prevalência dos sinais clínicos foi maior quando comparada ao trabalho de KOUTINAS et al. (2004) que avaliaram os sinais clínicos em animais infectados por *Leishmania infantum* na Grécia. Neste estudo, os

autores concluíram que a sensível diminuição dos sinais clínicos apresentados quando comparados com outros trabalhos, se deva a maior consciência dos proprietários e veterinários, e uma maior qualidade dos diagnósticos em animais assintomáticos, evitando a cronicidade do caso. Entretanto FEITOSA et al. (2000) não obtiveram a mesma prevalência em um estudo retrospectivo de 215 animais infectados naturalmente, com valores próximos aos encontrados neste estudo.

Frente às observações de BURACCO et al. (1988); FERRER (2002), que durante o curso da doença pode haver proliferação generalizada de linfócitos B, plasmócitos, macrófagos, histiócitos, e do próprio parasito, resultando em linfomegalia, no presente estudo, a linfadenopatia foi verificada em quinze animais, e não houve prevalência quanto aos linfonodos envolvidos. Nos animais oligossintomáticos, tal manifestação, também foi a mais descrita, onde do total de oito animais, seis apresentavam o aumento, podendo indicar uma fase inicial da doença. Entretanto, FEITOSA et al. (2000), observaram que 81% dos animais apresentaram linfomegalia e que os linfonodos mais afetados foram os poplíteos.

O aumento de volume de linfonodos superficiais não apresentou relação direta com a observação microscópica de parasitos.

As lesões dermatológicas também apresentaram uma maior prevalência onde foram descritas alopecias e/ou descamação localizada e generalizada; dermatite necrótica de pina e descamação; dermatites em plano nasal e em saliências ósseas; e alopecia peri-ocular.

As dermatopatias estiveram presentes na maioria dos casos, quatorze animais, e foram prevalentes em animais sintomáticos 10/12 (83,33%) quando comparadas com animais oligossintomáticos 4/8 (50%).

A onicogribose, que foi visualizada em 9/20 (45%) dos animais, também é uma característica marcante da doença e é considerada um sinal patognomônico por alguns autores (FERRER e SLAPENDELL, 1988; GENARO, 1993).

O emagrecimento verificado em 9/20 (45%) dos animais, segundo KONTOS e KOUTINAS, 1993, normalmente é atribuído ao comprometimento renal e hepático, com quadros azotêmicos ou ictéricos, e consequente anorexia. Como todos os animais do estudo, inicialmente não apresentaram

alterações da função renal e hepática, tão pouco a referência de anorexia, o emagrecimento pôde ser atribuído ao comprometimento visceral, que é freqüente nos animais infectados.

As atrofias da musculatura esquelética estiveram presentes em 4/20 (20%) e mais preferencialmente em regiões da cabeça (fossa temporal e músculos mastigatórios). VAMVAKIDIS et al. (2000), apontaram a presença do parasita e eventos inflamatórios e necróticos na fibra muscular, responsáveis pela perda da musculatura.

Nos animais com comprometimento oftálmico 2/20 (10%), a uveíte foi à alteração mais freqüente dentre as alterações oftalmológicas, associada a edema corneal e blefarite respectivamente. Outros estudos (SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999) apontam uma prevalência maior de patologias oculares em cães com LVC, variando entre 16 e 80,49%.

No presente estudo, os dois animais que apresentaram uveíte não resistiram ao protocolo terapêutico e foram a óbito. Ainda que a nefrotoxicidade do fármaco terapêutico possa ser atribuída, estes animais eram inicialmente sintomáticos, com positividade na IHQ de pele e na CAAF de linfonodo, demonstrando a severidade do quadro clínico. O mesmo foi referido por KOUTINAS (2004), para cães com uveíte de área endêmica, que apresentam baixos títulos de anticorpos e deficiente resposta terapêutica.

Durante o estudo houve remissão significativa e progressiva dos sinais clínicos, mais evidente nos cães sintomáticos, que foi revertida 3 meses após o início do tratamento, em oligossintomáticos. A remissão completa dos sinais clínicos em todos os animais ocorreu com doze meses. Ao término do período de observação, quinze animais 15/20 (75%) eram assintomáticos, e 2/20 animais (10%), que eram inicialmente sintomáticos, apresentaram recidiva dos sinais clínicos. Durante o estudo, 3/20 animais (15%) vieram a óbito, evidenciado aos doze e quinze meses do início da terapia.

A melhora clínica verificada durante o tratamento, vai ao encontro da pesquisa realizada por LAMOTHE, (1997); que evidenciou melhora em 80% dos animais tratados com anfotericina b; DELGADO, (2000) que obteve 95% de melhora clínica; e LAMOTHE, (2001) com 89% de melhora clínica. A ausência de sinais clínicos poderia diminuir a infecciosidade para

flebotomíneos conforme os trabalhos de TRAVI et al. (2001) e COUTENAY, (2002), que trabalharam com xenodiagnóstico.

A recidiva do quadro foi verificada em dois animais, indicando uma ineficiente resposta terapêutica, ou uma deficiente resposta imune celular. Alguns autores (PINELLI, 1999; FERRER, 2002; BELKAID, 2000) apontam que o sucesso do tratamento está diretamente ligado à recuperação da resposta imune celular com supressão da resposta humoral, associado à produção de citocinas. KANE e MOSSER, 2001; verificaram o papel da citocina IL-10 com a progressão e reativação da doença, porém a IL-10 impediu a ativação de outros macrófagos, redução de IL-12 e TNF α , essenciais para recuperação clínica. Segundo CHIA e Mc MANUS (1990), a anfotericina b pode estimular a produção de TNF α e auxiliar na resposta imune celular. FERRER (2002) refere que além da imunocompetência individual, o número de promastigotas metacíclicas inoculadas pode interferir no restabelecimento da resposta imune e no sucesso da terapia. Mesmo que a prevenção através de colares repelentes tenha sido utilizada, a possibilidade de reinfecções não pode ser descartada.

Os animais que apresentaram recidiva do quadro, inicialmente eram sintomáticos, e positivos quanto à presença de parasitos pela IHQ e CAAF, sugerindo grande infecciosidade.

Recidiva do quadro clínico também foi referida em outras pesquisas (LAMOTHE, 1997; DELGADO, 2000; OLIVA et al., 1995).

A reativação da doença ocorreu após o sucesso da terapia convencional no homem (MAROVICH et al., 2001).

Todos os animais (100%) apresentaram anticorpos anti-leishmania no teste imunoenzimático de ELISA antes do tratamento, e 18 meses após a terapia, houve soroconversão, e dos 17 animais que terminaram o estudo, 11 (64,70%) se mostraram negativos, 2 (11,76%) considerados suspeitos, e 4 (23,53%) ainda apresentavam título de anticorpos, sendo considerados positivos.

Os animais foram considerados suspeitos quando estes apresentaram resultados “border line” de densidade óptica.

Segundo FERRER, et al. (1995); a avaliação da resposta imune é baseada principalmente no título de anticorpos anti-leishmania e no

proteinograma. Tem sido demonstrado que os títulos de anticorpos está correlacionado com a severidade dos sinais clínicos (FERRER et al., 1995). Neste estudo não foi observada tal correlação entre a severidade do quadro clínico com os resultados de ELISA, quando foi verificada a presença de animais assintomáticos que ainda permaneciam soropositivos. MANCIANTI et al. (1988), também não evidenciou correlação com a sorologia e a severidade do quadro.

Entretanto, de acordo com FERRER et al. (1995); após a terapia se observa uma diminuição lenta dos títulos de anticorpos e que muitos cães ainda permanecem soropositivos, mesmo após a cura clínica. A avaliação da resposta terapêutica obtida pela normalização do proteinograma e pela diminuição dos títulos de anticorpos são indicadores da boa resposta e prognóstico favorável.

A atividade da anfotericina b no controle da resposta humoral foi demonstrada através da inibição da função das células B, T e polimorfonucleares, que pode estar relacionada com a toxicidade pelo desoxicolato de sódio, que esteve presente na preparação clínica utilizada neste estudo (MARMER et al., 1981; WALLS e KEY, 1982).

BOGDAN et al. (2000); apontou a persistência de amastigotas em fibroblastos de linfonodos, e que mesmo em estado de latência, poderiam constantemente estimular uma resposta imune com títulos de anticorpos mesmo após o tratamento.

Segundo EVANS et al. (1990); MANCIANTI et al. (1995); GENARO, (1988); PARANHOS-SILVA et al. (1996); o teste ELISA apresenta boa sensibilidade e especificidade.

O balanço entre a resposta imune humoral e celular é apontado por vários autores (NOLI, 1999; PINELLI et al., 1999; DAY, 2004) como sendo fator preponderante para a resistência do hospedeiro e o restabelecimento clínico pós-terapia. A diminuição dos títulos de anticorpos, verificado através da soroconversão, possibilitou o desenvolvimento de uma resposta imune celular forte que contribuiu no sucesso da terapia e na melhora clínica dos cães.

Por ser uma doença caracterizada pelo comprometimento de células do sistema macrofagocitário, o encontro de parasitos em órgãos linfóides, em

especial nos linfonodos, ou alterações da celularidade, são esperados em animais infectados.

No presente estudo, a ausência de parasitos no linfonodo, que foi verificado em 70% dos animais, demonstra o potente efeito leishmanicida da droga.

MOREIRA, (2007), trabalhando com 89 cães naturalmente infectados, avaliou a sensibilidade das amostras na CAAF, em animais sintomáticos (75,61%), oligossintomáticos (32%), e assintomáticos (39,13%). A resposta imune celular efetiva pode levar a uma maior destruição de formas amastigotas, dificultando sua visualização no aspirado de linfonodo. Após a terapia, a diminuição dos níveis de anticorpos séricos e conseqüentemente a redução da resposta imune humoral, verificado no teste de ELISA e do proteinograma, podem ter contribuído para tal destruição (PINELLI et al., 1999).

GENARO, (1993); relata que a ausência de parasitos no exame parasitológico por punção em órgãos linfóides, em especial linfonodos e medula óssea, em animais sorologicamente positivos, se deve a ocorrência de períodos de baixo parasitismo. No entanto, ainda que a técnica de CAAF apresente uma especificidade alta (100%), e apesar da sensibilidade baixa (FERRER, et al., 1995; GRADONI, et al., 1988) técnicas mais sensíveis como a PCR podem verificar a ausência de parasitos no linfonodo.

Uma das anormalidades bioquímicas marcantes verificadas em animais com leishmaniose visceral é a disproteinemia, conseqüente a uma hiperproteinemia associada a hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (AMUSATEGUI, et al. 1998; BANETH, 1998).

No nosso estudo, os níveis de proteína total estiveram acima dos normais em todos os animais, independente de sua condição clínica. No entanto, os valores maiores foram registrados nos cães sintomáticos. A elevação dos valores de proteína total está relacionada com o tipo de resposta imune humoral, resultante de uma ativação de linfócitos B (FERRER, 1995).

A diminuição da concentração sérica de albumina, verificada normalmente em animais infectados (FERRER, 1999; GENARO, 2003; SLAPENDELL et al., 1999), não foi observada neste estudo, sugerindo não haver comprometimento hepático no que tange a produção de albumina ou renal quanto à perda de proteína urinária. Somente em dois animais que eram

sintomáticos, houve diminuição da concentração sérica de albumina antes da terapia. Assim, ficou evidenciado que as alterações verificadas na concentração sérica de proteína total, estaria relacionada com a globulinemia.

Durante o tratamento, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa progressiva durante os momentos na concentração sérica de proteína total, que estava associada à diminuição dos níveis de globulina. Conforme já descrito por FERRER, (1995); a diminuição da resposta imune humoral, verificada pela diminuição dos títulos de anticorpos, é acompanhada pela recuperação do proteinograma e melhora do quadro clínico.

A inversão da relação albumina / globulina, assinalada por RIBEIRO et al. (2004), se mostra um bom parâmetro para avaliar a condição clínica, bem como o sucesso da terapia.

A diminuição significativa na relação albumina / globulina detectada antes do tratamento, recuperou aos padrões de normalidade nos momentos de observação. Todos os animais que apresentaram os menores valores na relação foram sintomáticos para o mesmo momento, indicando boa correlação com a gravidade do quadro.

A infecciosidade dos animais utilizando a pesquisa de parasitas na pele pela IHQ, também pode ser correlacionada com os valores obtidos da relação albumina / globulina. De acordo com RIBEIRO et al. (2004); em um estudo envolvendo 191 cães, foi verificado que nos animais onde foram encontrados parasitos na pele, 91,2% se mostraram com relação albumina / globulina menor que 0,6 e os que apresentaram maior positividade foram os que tiveram menor relação (0,4), demonstrando maior infecciosidade para flebotomíneos. Tal correlação também pôde ser observada no nosso estudo, onde 87,5% dos animais positivos na IHQ apresentaram valores menores que 0,6. Os animais que apresentaram recidiva do quadro também foram positivos na IHQ e apresentaram valores menores que 0,4 na relação albumina / globulina, indicando seu potencial infectivo e gravidade do quadro.

A eficácia do protocolo em longo prazo no controle da doença foi avaliada através da resposta sorológica (com a pesquisa de anticorpos anti-leishmania), parasitológica (CAAF de linfonodo e IHQ de pele), bem como a remissão dos sinais clínicos dos animais infectados.

No entanto foram avaliados também em curto prazo, os possíveis efeitos nefro e hepatotóxicos que a droga causa nos animais.

Diversos autores (BAGATIN e CUCÉ, 1983; MONTEIRO et al., 1993; TAVARES, 2002) relatam em animais submetidos à terapia com anfotericina b, sinais de nefrotoxicidade causada pela vasoconstrição e posterior diminuição do fluxo sanguíneo renal. Durante a terapia prolongada, alguns animais podem ainda apresentar náusea, vômito, diarreia, flebite localizada, febre, tremores (AMUSATEGUI et al., 1998) além de alterações hepáticas como icterícia (VALLADARES, et al., 1997; LAMOTHE, 1997).

A avaliação da concentração sérica de creatinina é freqüentemente interpretada como sendo uma medida importante para verificar o ritmo de filtração glomerular, sendo que sua concentração plasmática está inversamente proporcional ao ritmo de filtração glomerular (HENNEMANN et al., 1997). A uréia é livremente filtrada pelos glomérulos e, em presença de diminuição da filtração glomerular ocorre sua retenção (MEYER e HARVEY, 1998). Assim níveis séricos aumentados de creatinina e uréia são normalmente observados durante a terapia com anfotericina b.

Quadros de glomerulonefrites em animais infectados por leishmaniose são comuns, contra-indicando a terapia (LAMOTHE, 2000). No presente estudo, todos os animais apresentaram valores séricos normais de uréia e creatinina antes da terapia.

Durante a administração da anfotericina b, observados nos momentos (M1, M2, M3, M4), foram registrados aumentos significativos estatisticamente progressivos na concentração sérica de creatinina e uréia. Estes resultados são concordantes com os obtidos por outros autores (VEADO et al., 2003; DELGADO, 2000; LAMOTHE, 2001) quando também foi notada variação nas concentrações séricas. No entanto, já em M4, notou-se uma diminuição dos valores, aproximando aos valores basais, observados em M5.

BAGATIN (1983), refere que a nefrotoxicidade provocada pela droga como sendo dose-dependente, porém não foi verificada neste estudo, onde as maiores médias foram obtidas em M3, tanto na concentração sérica de uréia quanto de creatinina. SANTIN (2003), também não verificou tal dependência quando avaliou laboratorialmente 10 cães normais submetidos à terapia com anfotericina b.

A dose de 0,5 mg / kg referida em vários regimes terapêuticos foi desenvolvida empiricamente, baseando-se nos limites de toxicidade e em dados obtidos em trabalhos científicos (DAVIS, 1981), sendo a utilizada neste estudo.

No protocolo utilizado, houve um aumento, porém transitório das concentrações séricas de uréia e creatina, conforme também verificado em outros trabalhos (LAMOTHE, 1997; OLIVA, 1995), e os três animais que vieram á óbito no final do estudo, ainda que durante os momentos de observação tais aumentos foram evidentes, indicando nefrotoxicidade, estes eram sintomáticos antes da terapia.

A utilização de cetoanálogos é descrita em vários regimes terapêuticos no controle da insuficiência renal, tanto na medicina humana (CHAUVEAU et al., 1999) quanto na veterinária (VEADO et al., 2003). No presente estudo, nos animais (cães n.2, n.4, n.5, n.7, n.10, n.14, n.16, n.18, n.20) que durante os momentos de observação apresentaram valores de creatinina superiores à 2,5 mg/dl, foi instituída terapia adjuvante com cetoanálogos, permitindo um maior controle das concentrações séricas de uréia e creatinina.

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima que está localizada no citosol e é considerada hepatoespecífica, sendo o aumento sérico um indicador sensível e específico de dano hepatocelular (KANEKO, 1997).

Algumas drogas, inclusive os glicocorticóides, em doses terapêuticas podem levar a um aumento acima de 4 vezes nos valores normais de ALT (KANEKO, 1997).

A aspartato aminotransferase (AST) que está localizada na mitocôndria dos hepatócitos (60 a 80%) e o restante de forma solúvel no citosol, é liberada após um dano celular severo, de maneira a não apenas alterar a permeabilidade da célula. Conseqüentemente, a ALT sérica eleva-se mais rapidamente e usualmente está em níveis mais altos que a AST (COLES, 1992).

O aumento destas enzimas hepáticas implica na tentativa de manutenção da viabilidade e regeneração dos hepatócitos, podendo ser usada na interpretação do avanço da doença. Um aumento acentuado da atividade sérica da ALT e AST sugere um insulto hepático difuso e severo, especialmente se a icterícia estiver presente (KANEKO, 1997).

Alterações na concentração sérica de ALT e fosfatase alcalina ocorreu em 80 cães portadores de leishmaniose visceral, com elevações respectivamente em 61 e 51% (SLAPPENDEL e FERRER, 1998).

Não foram observadas alterações nas concentrações séricas de ALT e AST em M0 nos animais estudados, levando em consideração como critério de inclusão a função hepática normal.

Durante a administração da anfotericina b, não foram verificadas alterações nas médias das concentrações séricas de ALT e AST dos animais estudados durante os momentos. As maiores médias, porém dentro dos parâmetros normais, foram observadas nos momentos (M2, M3, e M4), quando estava associada a prednisolona.

Durante a administração ou posteriormente a terapia, não foram observados sintomas de náusea, vômito, flebite, e icterícia, descritos por outros autores (AMUSATEGUI et al., 1998; VALLADARES, et al., 1997; LAMOTHE, 1997).

De acordo com DENEROLLE et al. (1996); NOLI, (1999); a utilização de glicocorticóides no tratamento da LVC, é amparada no intuito de deprimir a imunidade humoral e conseqüentemente reduzir os efeitos causados pelo depósito de imunocomplexos nos órgãos e tecidos, particularmente em animais com insuficiência renal.

Ainda que KANEKO, (1997); descreva a possibilidade dos glicocorticóides provocarem aumentos na concentração sérica de ALT, e conseqüentemente hepatopatias, não foram observadas tais alterações no presente estudo decorrente da administração deste fármaco.

As conclusões dos trabalhos de GRADONI et al. (1998); ALVAR et al. (1994); BANETH et al. (2001); RIBEIRO, (2002); demonstram que: a redução ou a ausência do parasitismo cutâneo, a melhora da condição clínica e principalmente a recuperação da resposta imunecelular, controladora da infecção, são apresentadas como ferramentas principais para avaliar a eficácia do tratamento, considerando ainda que poderia ocorrer uma redução da capacidade infectante para flebotomíneos e conseqüentemente uma diminuição da prevalência da doença canina e humana em áreas endêmicas De acordo com BANETH et al. (2001), o tratamento de cães com alopurinol, promoveu melhora clínica, diminuição dos títulos de anticorpos, e diminuição

significativa de infectividade para flebotomíneos, quando estes foram submetidos ao xenodiagnóstico.

Pelo fato do xenodiagnóstico ainda não ser uma técnica totalmente incorporada na medicina veterinária, faz com que a pesquisa de parasitas na pele pelo método imunoistoquímico, o qual propicia a identificação de amastigotas em animais infectados, independentes de sua condição clínica, portanto um importante aliado para avaliar infectividade e o papel do cão como reservatório. A aplicação dessa metodologia em biópsias de pele aumenta sensivelmente a acurácia do diagnóstico, sendo constantemente utilizada em animais que foram submetidos a diversos protocolos de tratamento a fim de demonstrar a infecciosidade para flebotomíneos (FERRER et al., 1988).

No presente trabalho, nos animais submetidos ao protocolo terapêutico com anfotericina b associada ao alopurinol e a prednisona, foi observado diminuição estatisticamente significativa da positividade na IHQ de pele, já que dos 17 animais que terminaram o estudo, somente em um (5,88%) foram identificadas formas parasitárias pelo exame utilizado. A positividade da pele, também pôde ser correlacionada com a sintomatologia clínica, visto que na maioria dos animais positivos pela IHQ antes da terapia, 87,5% foram considerados sintomáticos no mesmo momento, indicando uma diminuição da presença de parasitas e conforme era observada a melhora clínica. Esses resultados corroboram com os estudos de TRAVI et al. (2001) que também observaram através de xenodiagnóstico grande infecciosidade para flebotomíneos nos animais sintomáticos e nenhum grau de infecciosidade nos animais assintomáticos.

Nos animais que apresentaram positividade pela IHQ de pele em M0, foram observadas alterações dermatológicas em 7 dos 8 animais (87,5%) que foram traduzidas pela presença de alopecias localizadas e generalizadas, descamação cutânea, e dermatites descamativas em região de pina, saliências ósseas e plano nasal. FONDEVILA et al. (1997) também observaram relação na presença do parasitismo cutâneo com as principais alterações dermatológicas. Segundo os autores nas lesões alopecicas localizadas, é verificado uma imunocompetência epidérmica maior, com diminuição da quantidade de parasitos, quando o mesmo foi comparado com as lesões

nodulares granulomatosas. No nosso estudo, pela diversidade das manifestações dérmicas apresentadas, não foi possível verificar tal correlação.

Não foi registrado em nenhum dos casos de cães submetidos a este protocolo, dentro dos cuidados que foram utilizados, que tenha havido a ocorrência na mesma residência de um caso humano de LV.

Ao longo dos anos nota-se que a LVC e humana, está em franca expansão no Brasil, sendo diagnosticada em grandes centros urbanos que até pouco tempo não existiam. É notório que uma vez instalada em uma região, dificilmente consegue-se erradicá-la pelos diversos fatores citados neste trabalho.

Assim outras pesquisas devem ser conduzidas na busca de novos conceitos sobre a biologia do vetor, bem como o comportamento dos reservatórios, com o objetivo principal de reduzir a prevalência canina e conseqüentemente a humana.

As ações devem ser priorizadas para o controle do vetor, seguido pela busca da redução da susceptibilidade na população humana, mas sem deixar de lado o controle de reservatórios, realizado através da eutanásia.

Entretanto, a condição de infecciosidade do cão, verificada através da pesquisa de parasitos na pele ou pelo xenodiagnóstico, não deve ser desconsiderada, necessitando objetivar outras formas de controle da doença canina em benefício da Saúde Pública.

8. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais empregadas, pôde-se concluir que:

- O protocolo terapêutico promoveu remissão total dos sinais clínicos em 75% dos animais.
- Houve soroconversão pós-tratamento em 55% dos animais.
- Os valores de proteína total, globulina, e relação albumina / globulina foram restabelecidos aos parâmetros de normalidade após o tratamento.
- O efeito leishmanicida da terapia foi comprovado pela ausência de parasitos no exame citopatológico de aspirado de linfonodo e na imunoistoquímica
- O aumento significativo e progressivo das concentrações séricas de creatinina e uréia ocorreu após o início da terapia, restabelecendo a normalidade após a aplicação da anfotericina b.
- O uso de cetoadálogos colaborou no restabelecimento do perfil renal.
- A função das enzimas hepáticas ALT e AST não demonstrou alterações estatisticamente significativas durante a terapia.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALENCAR, J.E. **Calazar canino**. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. 1959, 103 f. Tese (Livre-docência) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ALENCAR, J.E; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESE, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.706-717.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann. Trop. Méd. Parasitol.**, v.88, n.2, p.371-378, 1994.

AMUSATEGUI, I. Valoración de la respuesta terapêutica a largo plazo (presentación o no de recidivas) em 104 casos de leishmaniose canina. In: **XXXIII Congresso Nacional de AVEPA**, p.33., 1998, Santiago de Compostela. Anais... Santiago de Compostela: editora, 1998. p.114.

BADARÓ, R.; DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Editora Ateneu, 1996. p.1234 -1259.

BANETH, G. et al. Allopurinol treatment diminishes the infectivity of dogs leishmaniasis to *Lutzomyia longipalpis* sand flies. **Isr. Vet. Med. Assoc.**, v.56, n.2, p.55-60, 2001.

BANETH, G. A review of the treatment of canine leishmaniasis. In: **International Canine Leishmaniasis Forum**, 2., 2002., Proceedings...Sevilla, Spain, 2002.p.7-14.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the Biosis preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BATES, P.A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v.79, p.215-218, 1994.

BEAM, T.R. Antifungal agents. In: SMITH, C.A.; REYNARD, A.M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p.888-889.

BELKAID, Y. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J. Immunol.**, v.165, p.969–997, 2000.

BELKAID, Y. et al. The Role of Interleukin (IL)-10 in the Persistence of *Leishmania major* in the Skin after Healing and the Therapeutic Potential of Anti-IL-10 Receptor Antibody for Sterile Cure. **J. Exp. Med.**, v.194, n.10, p.1497–1506, 2001

BENNETT, J.E.; Fármacos antimicrobianos: fármacos antifúngicos. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: MacGraw Hill, 1996. p.863-875.

BORGES, K.D.A. et al., 2002. Uso de cetoanálogos em cadela com insuficiência renal crônica. In: **Simpósio de Nefrologia Veterinária**, 2002, Belo Horizonte. Anais.....Belo Horizonte, 2002, p.95-98.

BERRAHAL, F. et al. S. Canine leishmaniasis: Identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, v.55, n.3, p.273-277, 1996.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA, v.4, n.39, 2007.

BRAGA, M.D.M. et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel de filtro. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, v. 31, n.5, p.419-424, 1998.

BRAGATIN, E.; GUCÉ, L.C. Nefrotoxicidade da anfotericina b em relação á dose total administrada. **Ann. Brás. Dermatol.** , v.58, n.6, p. 261-264, 1983.

BRANDÃO-FILHO, S.; SHAW, J. Leishmaniasis in Brazil. **Parasitol. Today.**, v.10, n.9, p. 329-330,1994.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Nota Técnica** 30/01/2004: Uso do Antimoniato de Meglumina em cães. Disponível em: < <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/destaques/caes.htm>> Acesso em 10 jul. 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral** – Brasília, 2006.

BOGDAN, C. et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **J. Exp. Med.** v.191, n.12, p. 2121-2130, 2000.

BURACCO, P., ABATE, O., GUGLIELMINO, R., MORELLO, E. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. **J. Small. Anim. Pract.**, v.38, p.29-30, 1988.

BURDMANN, E.A.; VIEIRA, J.M.; VIDAL, E.C. Nefropatia tóxica e tubulointersticial. In: RIELLA, M.C. **Princípios de Nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.325-350.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. Aspectos Epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, Brasil. 2004. 225 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – USP.

CARDOSO,L. et al. Use of leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. **Vet. Parasitol.**, v.79, p.213-20, 1998.

CAVALIERO, T. et al. Clinical, serologic, and parasitological follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **J Vet. Intern. Méd.**, v.13, p.330-334, 1999.

CHAGAS, E. Leishmaniose Visceral Americana. Nova entidade mórbida do homem da América do Sul. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.32, p.325-332, 1937.

CHAUVEAU, P. et al. Outcome of Nutritional Status and Body Composition of Uremic Patients on a Very Low Protein Diet. **Am. J. Kidney Dis.**, v.34, n.3, p.500-507, 1999.

CHIA, J.K.S.; MCMANUS, E.J. *In vitro* tumor necrosis factor induction assay for analysis of febrile toxicity associated with amphotericin B preparations. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.34, p.906-908, 1990.

COSTA, C.H.N. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.34, n.2, p.223-228, 2001.

COSTA, C.H.N. et al. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.**, v.182, p.997-1000, 2000.

COSTA, C.A. et al. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Soc. Bras. Med. Trop.**, v.24, n.1, p.21-25, 1991.

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

COWELL, R.L.; TYLER, R.D. **Diagnostic cytology of the dog and cat**. 3 ed. Gloeta: American Veterinary Publications, 1989, p.1-260.

DAVIS, L.E. Clinical pharmacology of amphotericin B. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.179, n.1, p. 83-84, 1981.

DAY, M.J. **Clinical immunology of the dog and cat**. London: Manson Publishing / The Veterinary Press, 1999. p. 288.

DAY, M.J. Implications of the immune system during infection by leishmania organism in canine. In: **International Congress on Canine Leishmaniasis**. 2004, Itália. **Proceedings...Itália 2004**, p.58-65.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar, no ceará. **O Hospital**, v.48, p.61-76, 1955.

DEANE, L.M.; GRIMALDI JR., G. Leishmaniasis in Brazil. In: CHANG, K.P. BRAY, R.S. **Leishmaniasis**. Amsterdam: Ed. Elsevier Science Publishers B.U., 1985. p.247-281.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev. Inst. Méd. Trop.**, v.4, p.198-212, 1962.

DELGADO, C.; SALCEDO, A. Valoracion Del tratamiento com anfotericina B wn 67 casos de leishmaniose canina. **Congresso Nacional da AVEPA**, 35., 2000, Madrid. **Proceedings...Madrid, 2000**. p.337.

DENEROLLE, P. Leishmaniose canine: difficulté du diagnostic et du traitement. **Prat. Med. Chir. Anim. Cie.**, v.31, p.137-145, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.27, p.305-318, 2004.

DIETZE, R. et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v.25, p.1240-1242, 1997.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p.125-130, 1996.

ESCOBAR P, YARDLEY V, CROFT SL. Activities of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine), Ambisome, and Sodium Stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient mice. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 45, p.1872-1875, 2001.

EVANS, T.G. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnostic methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.42, n.2, p.118-123, 1990.

FARIAS, M. R.; GIUFRIDA, R. Antifúngicos. In: ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2002, p.59-72.

FEITOSA, M.M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clin. Vet.**, v.5, n.28, p.36-44, 2000.

FERNÁNDEZ-PÉREZ F.J. et al. Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, p.652-653, 1999.

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

FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Rec.**, v.136, p.514-516, 1995.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. **Kirk's Current Veterinary Therapy XI**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992, p.266-270.

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

FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Rec.**, v.136(20), p.514-516, 1995.

FERRER, L. The Patology of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution, **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**, Sevilla, Spain – 2002.

FISHER, L.D., BELLE, G.V. **Biostatistics**: a methodology for the health sciences. New York: Wiley-interscience, 1993. 991p.

FONDATI, A.; FONDEVILA, D. Dermatological aspects of canine leishmaniosis: clinical and histopathological cases. **International Congress on Canine Leishmaniasis**, 2004, Itália. **Proceedings...**Itália, 2004. p.36-40.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.56, p.319-327, 1997.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. 202f. **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GENARO, O. et al. Naturally occurring leishmaniasis in dogs: clinical aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.83, p.43, 1988.

GENARO, O. Leishmaniose visceral. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana** 8. ed. São Paulo: Livraria e Editora Ateneu, 1991. cap. 9, p.55-72.

GEORGE, J.W. et al. Canine Leishmaniasis with amyloidosis. **Vet. Pathol.**, v.13, n.5, p.365-373, 1976.

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

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: **International Canine Leishmaniasis Forum**, 2002, Sevilla, Spain. **Proceedings...Sevilla**, Spain, 2002. p.7-14.

GRADONI, L. et al. Studies on leishmaniasis control. 2. Effectiveness of controlmeasures against canine leishmaniasis in the island of Elba, Italy. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.82, n.3, p.568-571, 1998.

HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C. Fármacos antifúngicos. In: **Farmacologia ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 1998, p.337-345.

HENNEMANN, C.R.A. Atividade da gama glutamil transpeptidase urinária, dosagens séricas de uréia e creatinina como meios diagnósticos auxiliares na nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeos em cães. **Cienc. Rural.**, Santa Maria, v.27, n.2, p.237-244, 1997.

HOMMEL, M. et al. The micro – ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Méd. Parasitol.**, v.27, p.213-218, 1978.

IKEDA, F.A. Avaliação hematológica, bioquímica e parasitológica, de cães naturalmente acometidos por Leishmaniose visceral, submetidos a diferentes protocolos de tratamento. São Paulo. 2004. 184 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP – Botucatu.

JUTNER, C.R. et al. Evaluation of the potential causes of epistaxis in natural canine leishmaniasis. **Vet. Rec.**, v.149, p.176-179, 2001.

KANE, M. M.; MOSSER, D.M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis **J. Immunol.**, v.166, p.1141–1147, 2001.

KANECO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997, 932 p.

KEENAN, C.M. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. Infection, clinical disease and clinical pathology. **Vet. Pathol.**, v.21, p.74-79, 1984.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old World canine leishmaniasis. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v.15, p.949-960, 1993.

KOUTINAS, A.; SARIDOMICHELAKIS, M. Clinical Aspects of canine leishmaniasis in Greece. **International Congress on Canine Leishmaniasis**, 2004, Itália. **Proceedings...Itália 2004**. p.28-34.

LAMOTHE, J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. **J. Small Anim. Pract.**, v.42, p.170-175, 2001.

LAMOTHE, J. La leishmaniose canine: limites diagnostiques de la sérologie á partir de deux cãs cliniques. **Prat. Med. Chir. Anim. Cie.**, v.37, p.55-59, 2002.

LAMOTHE, J. Essai de traitement de la leishmaniose canine par l'amphotéricine B, **Prat. Méd. Chir. Anim. Cie.**, v.32, p.133-141, 1997.

LIMA, V. M. F. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, n.4, p.485-489, 2003.

LINARDI, P.M., NAGEM, R.L. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. **Rev. Bras. Biol.**, v.33, p.529–538, 1973.

LING, G.V. et al. Xanthine-containing urinary calculi in dogs giving allopurinol. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.198, n.11, p.1935-1940, 1991.

LOPEZ, R. et al. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **J. Vet. Méd.**, v.43, p.469-74, 1996.

LUVIZOTTO, M.C.R. et al. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba-SP. **Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, 2., 1999, Águas de Lindóia, São Paulo. **Anais...Aguas de Lindóia**, 1999. p.38.

Mc CURNIN; POFFENBAGER, E.M. **Small animal physical diagnosis and clinical procedures**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991.

MALIK, R. Combination chemotherapy of canine and feline cryptococcosis using subcutaneously administered amphotericin B. **Aust. Vet. J.**, v.73, n.4, p.124-128, 1996.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.82, p.566-567, 1988.

MARMER D.J. et al. Ketoconazole, amphotericin B, and amphotericin B metil ester: Comparative *in vitro* and *in vivo* toxicological effects on neutrophil function. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 20, p. 660-665, 1981.

MAROVICH, M.A. et al. Leishmaniasis Recidivans. Recurrence after 43 Years: A Clinical and Immunologic Report after Successful Treatment. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p.1076–1079, 2001.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.1, n.4, p.432-446, 1985.

MEYER, J.D.; HARVEY, W.J. Assessment of renal function, urinalysis, and water balance. In: Veterinary laboratory medicine interpretation and diagnosis. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998, p.221-235.

MOLINEUZ, D.H.; KILLICK-KENDRICK, R. Morphology, ultrastructure and life cycles. The Leishmaniasis in Biology and Medicine, London. PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R., Eds: London: **Academic Press**, 1987. v.1, p.121-76.

MONTEIRO, J.M.; SEGURO, A.C.; ROCHA, A.S. Nefrotoxicidade aguda da anfotericina b no cão. **Hosp Clin Fac Med S Paulo**, v.48, n.2, p. 54-59, 1993.

MOREIRA, M.A.B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet. Parasitol.**, v.145, p.245-252, 2007.

MORITZ, A.; STEUBER, S.; GREINER, M. Clinical follow-up after treatment of canine leishmaniasis. **Tokai J. Exp. Clin. Med.**, v.23, p.279-283, 1999.

NAIR, M.P.; SCHWARTZ, S.A. Immunomodulatory effects of amphotericin B on cellular toxicity of normal human lymphocytes. **Cell. Immunol.**, v.70, p. 287-300, 1982.

NETO, V.A. In: **Antibióticos na prática médica**, 1985.

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

OIE. Leishmaniosis. In: **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines**. 4 ed., Paris: Office International des Epizooties, 2000. p.803-812.

OLIVA, G.; GRADONI, L.; CIARAMELLA, P. et al. Activity of liposomal amphotericine B in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*, **J. Antimicrob. Chemother.**, v.36, p.1013-1019, 1995.

OLIVEIRA LIMA, J.W.; FIUZA, I.R.; DIAS BRANCO, F.J. Correlação entre prevalência do calazar no cão e incidência no homem, em áreas endêmicas do Estado do Ceará. In: **Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32., Goiânia, **Resumos...** Goiânia: editora, 1996. p.146.

OTERO, A.C. et al. Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from sororeactive Brazilian blood donors. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.62, p.128-131, 2000.

PARANHOS-SILVA, M. et al. Acrosssectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.55, n.1, p.39-44, 1996.

PENÃ, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). **Vet. Ophthalmol.**, v.3, n.1, p.35-41, 2000.

PERFECT JR, GRANGER DL, DURACK DT. Effects of antifungal agents and gamma-interferon on macrophage cytotoxicity for fungi and tumor cells. **J. Infect. Dis.**, v.156, p.316-323, 1987.

PINELLI, E., RUTTEN, V.P.M.G., RUITENBERG, E.J. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In: **International Canine Leishmaniasis Forum**, 1999, Barcelona, Spain. **Proceedings...**Barcelona, Spain, 1999. p. 60-64.

PLUMB, D.C. Drug monographs-amphotericin b. In: **Veterinary drug Handbook**. Minnessota: Iowa state university press., 3.ed., 1999., p.38-42.

QUINNELL, R.J. et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v.122, p.253-261, 2001.

RANG, H.P.; DALE, M.; RITTER, J.M. Fármacos antifúngicos. In: **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001, p.605-608.

REALE, S. et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.9, p.293-295, 1999.

RIBEIRO, V.M. et al. β^2 γ – Globulin Fractions in Dogs infected with *Leishmania infantum* and cutaneous infectiousness using an immunohistochemical method. **International Congress on Canine Leishmaniasis**, 2004, Itália. **Proceedings**: Itália, 2004.

RIBEIRO, V.M. et al. Padrão histológico e infectividade da pele de cães com leishmaniose visceral antes e durante o tratamento com antimoniato de n-metil glucamina e allopurinol. **XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, VI Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses**, Programa e Resumos, Uberaba-MG, 2002.

ROSS, R. Further notes on leishman s bodies. **Br. Med. J.**, v.2, p.1401, 1903.

ROURA, X. et al. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v.133, p.37-47, 2005.

ROZE, M. Manifestations oculaires de la leishmaniose canine. **Rev. Med. Vet.**, v.162, p.19-26, 1986.

RUBIN, S.I. Nefrotoxicidade da anfotericina B. In: Kirk, R.W. **Atualização Terapêutica Veterinária pequenos animais IX**. 9.ed. São Paulo: Manole, 1988. p.1442-1447.

SANCHEZ, M.A. et al. Organ-Specific Immunity In Canine Visceral Leishmaniasis: Analysis Of Symptomatic And Asymptomatic Dogs Naturally Infected With Leishmania Chagasi. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.70, n.6, p.618-624, 2004.

SANTIN, F. Acompanhamento laboratorial da função renal de cães sadios tratados experimentalmente com doses terapêuticas de anfotericina b. 2003. 76f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP – Botucatu.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Fungal skin diseases. In: Miller, W.H. **Small animal dermatology**. Philadelphia: Saunders, 2001, p.337-442.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical Microbiology and Infectious Disease of the Dog and Cat**. Philadelphia: W.B.Saunders Co., 1990. p.450-458.

SLAPPENDEL, R.J.; TESKE, E. A review of canine leishmaniasis presenting outside endemic areas. In: Canine Leishmaniasis, An update. **Canine Leishmaniasis Forum**, 1999, Barcelona. **Proceedings...**Barcelona: Ed. R. Killick-Kendrick. 1999. p.54-59.

SMITH, H.W. Renal physiology. In: DIBARTOLA, S.P. **Fluid therapy in small animal practice**. 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders., 2000, p.26-41.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to Leishmania infection. **Curr. Adv. Immunol.**, v.74, p.275-317, 2000.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine visceral Leishmaniosis. In: CHARMICHAEL, L. **Recent advances in canine infectious diseases**. Ithaca: Int. Vet. Inf. Serv., 2001. p.1-14.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Int J Parasitol**, v.35, n.1, p.63-73, 2005.

TAFURI, W.L.; MICHALICK, M.S.M.; RIBEIRO, V.M. Avaliação clínica, sorológica, e infectividade da pele em um cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, antes e durante tratamento com antimonial e allopurinol. In: **Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, 20, Águas de Lindóia. Anais...Águas de Lindóia, 1999. p.27.

TAFURI, W.L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.96, n.3, p.203-212, 2001.

TASSI, P.; ORMAS, P.; MADONNA, M. et al. Pharmacokinetic of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. **Res. Vet. Sci.**, v.56, p.144-50, 1994.

TAVARES, W. Poliênicos e outros antibióticos antifúngicos. In: **Manual de antibióticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p.747-764.

TRAVI, B.L. et al. Canine Visceral Leishmaniasis In Colombia: Relationship Between Clinical And Parasitologic Status And Infectivity For Sand Flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.64, n.3-4, p.119–124, 2001.

VALLADARES, J.E. et al. Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v.141,n.22, p.574-575, 1997.

VALLADARES, J.E. et al. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using na antimony liposomal formulation. **Vet. Parasitol.**, v.97, p.15-21, 2001.

VAMVAKIDIS, C.D. et al. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Vet. Rec.**, v.146, p.698-703, 2000.

VEADO, J.C.C. et al. Associação de cetoanálogos ao tratamento da leishmaniose visceral canina com doses elevadas de Anfotericina B. **Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA**, 24., 2003, Belo Horizonte. Anais...Belo Horizonte, 2003.

VOULDOUKIS, I. et al. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.40, n.1, p.253-256, 1996.

WALLS EV, KEY JE. Inhibition of proliferation of a murine myeloma cell line and mitogenstimulated B lymphocytes by the antibiotic amphotericin B (Fungisone). **Immunology.**, v.47, p.115-121, 1982.

WOLF JE, MASOFF SE. *In vivo* activation of macrophages oxidative burst activity by cytokines and amphotericin B. **Infect. Immunol.**, v.58, p.1296-1300, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Leishmaniasis. **Technical Report Series**, v.793, p.50-52, 1990.

YAMAGUCHI, H.; ABE, S.; TOKUDA, Y. Immunomodulating activity of antifungal drugs. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v.685, p.447-457, 1993.

ZATELLI, A. et al. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. **Am. J. Vet. Res.**, v.64, n.5, p.558-561, 2003.

10. TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO: REVISTA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – UNESP – BOTUCATU-SP.

Avaliação Clínico-Laboratorial de Cães Naturalmente Infectados por Leishmaniose Visceral, Submetidos à Terapia com Anfotericina B.

Palavras-chaves: Leishmaniose, cães, tratamento, anfotericina B.

Clinical-Laboratory Assessment of Dogs Naturally Infected with Visceral Leishmaniosis, Subjected to Amphotericin B - Based Therapy.

Key words: Leishmaniasis, dogs, treatment, amphotericin B

Evaluación Clínica de Perros y de Laboratorio Infectados Naturalmente por Profundamente visceral Leishmaniasis, Sometido a Tratamiento con Amphotericin B.

Palabras-clave: Leishmaniosis, perros, tratamiento, amphotericin B

Nogueira, F.S.¹⁶; Moutinho, F.Q.¹⁷; Luvizotto, M.C.R.¹⁸; Carvalho, L.R.¹⁹.

RESUMO

Constituiu objetivo desta pesquisa avaliar experimentalmente os efeitos decorrentes da anfotericina b em associação ao allopurinol e prednisona no tratamento de 20 cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* Todos os cães foram submetidos à análise clínica, sorológica e parasitologia, durante 18 meses. O protocolo terapêutico promoveu remissão total dos sinais clínicos em quinze animais, entretanto dois cães apresentaram recidiva do quadro clínico e três vieram a óbito. O efeito imunomodulador da anfoterina b foi demonstrado através da soroconversão e normalização do proteinograma. O efeito leishmanicida da terapia foi comprovado na ausência de parasitos no exame citopatológico de aspirado de linfonodo (CAAF) e na imunoistoquímica (IHQ).

ABSTRACT

The goal of this research was to experimentally assess the effects consequential of amphotericin B associated to allopurinol and prednisone on the treatment of twenty dogs infected by *Leishmania spp.* All dogs were submitted to routine physical examination, sorology and parasite detection for 18 months. The therapeutic protocol

¹⁶ Doutorando FMVZ – UNESP – Departamento Clínica Veterinária – Botucatu – SP.

¹⁷ Prof.Ass.Dr. FMVZ – UNESP – Departamento Clínica Veterinária – Botucatu – SP.

¹⁸ Prof^aAss.Dra. Curso de Medicina Veterinária – UNESP – Departamento de Patologia Animal – Araçatuba.

¹⁹ Prof.Ass.Dra. IB – UNESP – Departamento de Bioestatística – Botucatu - SP.

promoted complete remission of clinical signals in fifteen animals, however two dogs showed relapse and three came to die. Amphotericin B immunomodulatory effect was demonstrated through seroconversion and proteinogram normalization. The leishmanicidal effect of the therapy was confirmed by the absence of parasite in the lymphoid aspirate cytopathological (PAAF) exam and in immunohistochemical (IHQ) analysis.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue experimentalmente evaluar los efectos indirectos de amphotericin B asociados a alopurinol y prednisona sobre el tratamiento de veinte perros infectados por *Leishmania spp.* Todos los perros fueron presentados a la rutina examen físico, serológico y los parásitos detección de 18 meses. El protocolo terapéutico promovido remisión completa de la clínica señales en quince animales, sin embargo dos perros mostró una recaída y tres vino a morir. Amphotericin B inmunomoduladoras efecto fue demostrado mediante seroconversión y normalización del proteinograma. El efecto de la terapia fue confirmado por la ausencia de los parásitos en el linfoide y en inmunohistoquímica.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos anos, a Leishmaniose visceral (LV) vem merecendo atenção especial por parte dos clínicos veterinários e profissionais da saúde pública, tendo em vista ser uma antroponose e apresentar um aumento significativo do número de casos humanos e caninos. Atualmente é considerada como sendo uma das seis endemias prioritárias no Mundo e está presente em países do Velho e Novo Mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

O programa para o controle da leishmaniose visceral no Brasil proposto pela Fundação Nacional de Saúde, remonta à década de 50, e tinha como objetivo quebrar os elos epidemiológicos da cadeia de transmissão da doença através da eliminação de cães soropositivos, do controle de vetores através do uso de inseticidas e no tratamento gratuito da população humana (GONTIJO et al., 2004).

O enfoque dado para eutanásia dos cães, têm demonstrado ser ineficaz e dispendioso (DYE, C. 1996; DIETZE, et al., 1997; COSTA, 2001; COURTENAY, et al., 2002).

Ainda que o tratamento de cães com a doença seja realizado há muito tempo no Velho Mundo, no Brasil poucos estudos estão sendo conduzidos para verificar a sua eficácia.

A redução do parasitismo cutâneo, eliminação dos sinais clínicos, e principalmente a recuperação da resposta imunocelular controladora da infecção, poderiam levar a uma redução da capacidade infectante dos flebotomíneos e, conseqüentemente a uma redução da prevalência nas espécies canina e humana, principalmente em áreas endêmicas (ALVAR et al., 1994, RIBEIRO, et al., 2002).

As limitações com a terapia antimonial em cães, como a hipótese de indução de resistência parasitária, o alto custo, a toxicidade, a proibição, no Brasil, do uso deste fármaco em animais, demonstram a necessidade em buscar alternativas terapêuticas mais acessíveis e de maior eficácia.

Considerada durante muito tempo, como sendo a droga de segunda escolha no tratamento da Leishmaniose Visceral Humana, nos últimos anos a anfotericina b vem sendo amplamente utilizado nos casos resistentes à terapia com os antimoniais ou mesmo em pacientes imunocomprometidos HIV positivos. Isto é de extrema relevância, tendo em vista que também se observa na leishmaniose canina uma significativa diminuição da resposta imune, o que confere à espécie canina modelo prático para avaliar a resposta terapêutica (OLIVA et al., 1995).

A anfotericina b foi primeiramente descrita, em 1956, por Gold e colaboradores, quando estudavam cepas de *Streptomyces nodosus*, no Vale do Rio Orenoco, na Venezuela (BENNETT, 1996). No organismo, apresenta forte especificidade à membrana plasmática de fungos e protozoários, pela maior afinidade da droga ao ergosterol (o esterol da membrana dos parasitas) do que ao colesterol, que é o principal esterol encontrado na membrana plasmática de células animais (RANG et al., 2001).

Após ligar-se à membrana plasmática do parasita, forma um canal iônico que irá interferir na permeabilidade e nas funções de transporte celular, tendo como conseqüências a perda de íons intracelulares e de pequenas moléculas (RANG et al., 2001). Com a saída destes íons, principalmente do potássio, há o comprometimento do seu metabolismo podendo levar ao seu rompimento e morte celular (SCOTT et al., 2001). Associa-se a este antibiótico o desoxicolato de sódio, para facilitar o uso desse fármaco quando administrado pela via parenteral (NETO 1985). Tal associação demonstrou ser benéfica na inibição da função de células B, T e polimorfonucleares (MARMER et al., 1981).

A atividade imunomoduladora da anfotericina b têm sido estudada (YAMAGUCHI et al., 1993), através de um efeito imunoadjuvante sobre os linfócitos (NAIR e SCHWARTZ, 1982) e, um efeito imunoestimulante (PERFECT et al., 1987)).

OLIVA et al., 1995 conduziu os primeiros estudos em cães utilizando a anfotericina b lipossomal e observou resposta clínica satisfatória, com diminuição da linfocitose e esplenomegalia e melhora das lesões de pele, porém a cura parasitológica não foi conseguida.

No entanto outros trabalhos (LAMOTHE, 1997; DELGADO, 2000; LAMOTHE, 2001), também verificaram melhora do quadro clínico, diminuição dos níveis de anticorpos séricos, normalização do proteinograma e redução ou ausência do parasitismo cutâneo, de linfonodo e medula óssea.

Os possíveis efeitos adversos estão relacionados com a dose utilizada, causando nefrotoxicidade, pela intensa vasoconstrição renal, com posterior redução do fluxo sanguíneo (TAVARES, 2002).

A utilização do alopurinol é descrita por NOLI, (1999). Segundo o autor, as leishmanias não são capazes de sintetizar purinas, necessitando dos hospedeiros, portanto este fármaco atua no RNA parasitário, incorporando-o e estimulando a síntese de proteínas anormais, exercendo um importante efeito leishmaniostático.

BANETH et al. (2001) verificou diminuição significativa da infectividade dos animais para flebotomíneos, através de xenodiagnóstico, utilizando o alopurinol como terapia leishmaniostática.

A utilização de imunossupressores, em especial os glicocorticóides, na terapia da leishmaniose tem sido descrita (DENEROLLE, et al., 1996).

A leishmaniose canina se caracteriza pela sua enorme variabilidade clínica, devido a fatores individuais, grau de infestação, tempo de evolução da enfermidade e aos órgãos afetados (FERRER, 1995). Durante o curso da doença há proliferação de linfócitos B, histiócitos, macrófagos, plasmócitos, resultando em linfadenopatia generalizada e algumas vezes hepatoesplenomegalia (FERRER, 2002). Ocorre também, produção de grande quantidade de imunocomplexos, com posterior formação de processos inflamatórios degenerativos e necróticos em diversas regiões do organismo, constituindo o componente mais patogênico da enfermidade (FERRER, 2002; NOLI, 1999).

As manifestações clínicas mais comumente vistas são: as alterações dermatológicas (dermatite descamativa seca com ou sem alopecia; dermatite ulcerativa,

com localização predominante em saliências ósseas e margem interna da pila; dermatite nodular; hiperqueratose nasal e digital; pêlos opacos, além de uma dificuldade de cicatrização); onicogribose, oftalmopatias (blefaroconjuntivite, ceratoconjuntivite seca ou não, uveíte, conjuntivite folicular e membranosa e panoftalmite), emagrecimento, atrofia muscular preferencialmente em músculos esqueléticos mastigatórios e temporal, glomerulonefrites, e diáteses hemorrágicas (FONDATI et al., 2004; FERRER, 1999; SLAPENDELL, 1999; GENARO, 1993; KOUTINAS et al., 2004).

Ocorre também uma elevação das proteínas plasmáticas totais e na eletroforese sérica observa-se uma inversão da relação albumina/globulina, com aumento da fração gama, caracterizando uma hipergamaglobulinemia, com diminuição da albumina em alguns casos (FERRER, 1999).

A visualização de formas amastigotas em esfregaços de CAAF de linfonodo ou medula óssea, é o método de eleição para o diagnóstico de uma infecção estabelecida e disseminada na LVC, com 100% de especificidade. Entretanto, a sensibilidade pode ser baixa, pois depende basicamente da coleta, do profissional e principalmente da amostra obtida, que pode apresentar baixa densidade populacional de parasitas (GRADONI, 2002).

No diagnóstico sorológico da LVC, anticorpos específicos devem circular no sangue e serem detectados após alguns meses do contato do cão com o protozoário (LAMOTHE, 2002). A grande produção de anticorpos causada pelo parasitismo faz dos métodos sorológicos uma ferramenta importante, seja pelo diagnóstico individual da infecção e da enfermidade ou na aplicação de inquéritos epidemiológicos (GENARO, 1993).

A IHQ realizada em biópsias de pele, assim como em esfregaços e cortes histológicos de fígado, baço, linfonodo e medula óssea, aumentam sensivelmente a acurácia do diagnóstico, sendo constantemente utilizadas em animais que foram submetidos a diversos protocolos de tratamento, bem como demonstrar a infecciosidade para flebotomíneos (FERRER et al., 1992).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus Botucatu. Foram utilizados vinte cães adultos, machos e fêmeas, de raças variadas, com peso vivo variando entre 3 a 55 kg, provenientes de proprietários, portanto, animais infectados naturalmente por *Leishmania spp.*. Estes

animais foram submetidos a exame físico rotineiro (Mc CURNIN e POFFENBAGER, 1991) e conforme as manifestações clínicas apresentadas foram classificados em oligossintomáticos e sintomáticos, de acordo com MANCIANTI et al. (1988). Os cães foram alimentados com rações comerciais balanceadas variadas e água “*ad libitum*”, e mantidos em domicílio durante todo o estudo.

Os animais foram imunizados e tratados para ectoparasitas internos e externos e por questões éticas e para evitar a possibilidade de re-infecções, e existência de fonte infectiva, os animais receberam um colar á base de deltametrina^a, com reposição a cada 4 meses durante todo o experimento.

Todos os proprietários foram orientados sobre riscos do tratamento e da prevenção da doença, tendo seus cães incluídos no estudo após assinarem termo de autorização.

Para todos os animais, foi utilizado o protocolo terapêutico com anfotericina b^b na dose de 0,5 mg / kg de peso vivo / a cada 3 dias, perfazendo 48 dias e, totalizando 16 sessões. O fármaco foi diluído em solução glicosada a 5% na dose de 10ml / kg de peso vivo, e revestido com papel alumínio, para evitar a biodegradação decorrente da fotossensibilidade e, aplicada por via intravenosa lenta, durante 1 hora.

Foi adotada como terapia leishmaniosstática, o uso do alopurinol^c na dose de 10 mg / kg / de peso vivo / bid / v.o., durante 18 meses.

A prednisona^d foi utilizada na dose de 0,5 mg / kg / de peso vivo / sid / v.o., durante 2 meses, reduzindo-se a dose nas duas últimas semanas.

O experimento foi realizado durante 18 meses, sendo que constou da análise do proteinograma e da avaliação clínica dos cães, a cada 3 meses, da pesquisa de anticorpos séricos anti-leishmania e da análise imunoistoquímica, antes do início da terapia e após 18 meses, e da avaliação citopatológica do aspirado de linfonodo, realizada a cada 6 meses.

Foi realizada punção aspirativa com agulha fina de linfonodo poplíteo (CAAF) conforme técnica descrita por COWELL e TYLER, 1989; e após confeccionado esfregaço em lâminas que foram corados com Panótico^e e posteriormente examinados em microscópio óptico com objetiva de 100x, em imersão.

Os esfregaços foram examinados com o objetivo de identificar formas amastigotas no citoplasma dos macrófagos ou livres, como também avaliar os tipos celulares predominantes e, a reatividade das células do Sistema Fagocítico Mononuclear.

A pesquisa de anticorpos anti-leishmania no soro dos animais foi realizada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo a técnica descrita por LIMA et al., (2003).

Os fragmentos de pele fixados em formol tamponado a 10% foram submetidas às técnicas rotineiras de inclusão em parafina e realizado a reação de imunoistoquímica visando detectar amastigotas imunomarcadas, segundo TAFURI et al. (1999).

Foi adotado um escore para as variáveis, CAAF, sinais clínicos, teste de ELISA, e imunoistoquímica.

Para as variáveis quantitativas foi utilizada a análise de medidas repetidas na comparação das médias dos momentos. Para análise das proporções foi utilizado o teste do qui-quadrado e para análise dos escores foram utilizados os testes de Wilcoxon quando comparados dois momentos e de Friedman, quando foram comparados mais de dois momentos. O nível de significância utilizado foi de 5% (FISHER, et al., 1993).

RESULTADOS

As manifestações clínicas apresentadas, tanto nos animais classificados de oligossintomáticos (40%) quanto nos sintomáticos (60%), foram preferencialmente as linfadenopatias; dermatopatias, que se traduziram por dermatite ulcerativa e necrótica na região de pina e saliências ósseas, descamação e rarefação pilosa generalizada, dermatoses no plano nasal, alopecia peri-ocular, e onicogribose; emagrecimento; atrofia da musculatura esquelética, preferencialmente na região da cabeça (fossa temporal e músculos mastigatórios; e oftalmopatias (uveíte, edema corneal, e blefarite).

A linfadenomegalia foi mais evidente nos linfonodos poplíteos e em cervicais superficiais.

A melhora dos sinais clínicos já pôde ser observado com 3 meses do início do tratamento, independente dos animais serem sintomáticos ou oligossintomáticos, com a remissão completa de todos os animais sendo observada com 9 meses de tratamento, onde todos se mostraram assintomáticos. No entanto, em 2 animais classificados inicialmente em sintomáticos, foi verificada recidiva do quadro após 18 meses do protocolo. Durante o estudo, 3 animais vieram a óbito, verificado após 9 meses de terapia.

Na CAAF de linfonodo poplíteo, foram identificadas formas parasitárias livres e/ou no interior de macrófagos em 75% dos cães antes do início da terapia. A análise citológica mostrou reação linfocitária intensa com predomínio de linfoblastos, plasmócitos, macrófagos e corpúsculos de Russel. A ausência de parasitos, porém com alteração na celularidade, foi evidente em 15% das amostras e estes foram considerados suspeitos, enquanto que em 10% dos animais, ainda que sorologicamente positivos, não foi evidenciado amastigotas típicas, bem como reação linfoplasmocitária.

Durante os momentos de observação, houve uma redução na identificação de formas amastigotas no exame citológico. Somente em 1 animal, 9 meses após o início da terapia, foi detectado o parasito no esfregaço de linfonodo, ao mesmo tempo em que houve a recidiva dos sinais clínicos.

Na análise sorológica, decorridos 18 meses, 11 cães não apresentaram título de anticorpos anti-leishmania detectados pelo teste e foram considerados negativos, 4 ainda permaneceram positivos, e 2 considerados suspeitos. Deve-se ressaltar que 3 animais não terminaram o estudo, vindo á óbito.

Na avaliação imunoistoquímica de biópsia de pele da pina, foi observado antes do tratamento positividade em 40% das amostras dos cães, e quando correlacionada com os sinais clínicos observou que destes 87,5% eram do grupo sintomático.

A análise estatística mostrou diferença significativa quanto ao parasitismo cutâneo antes e depois do tratamento, identificando formas amastigotas imunomarcadas na pele de somente 1 animal, que apresentou recidiva clínica da doença após 18 meses, além de positividade no linfonodo e na sorologia.

Na avaliação do proteinograma, todos os animais mostraram aumentos nos valores de proteína total antes da terapia ($9,5 \pm 1,6$), com redução progressiva nos momentos subsequentes. Os valores foram restabelecidos à normalidade ($7,1 \pm 0,7$), 12 meses do início da terapia, quando mantiveram-se constantes até o final.

Com relação à albumina, nos momentos analisados, não foi observado diminuição ou aumento significativo à análise estatística. Os níveis de globulina estiveram acima dos de referência antes da terapia ($6,3 \pm 1,6$), com diminuição progressiva durante os momentos, e estes correlacionados com a diminuição dos valores de proteína total.

A relação albumina/globulina apresentou diminuição significativa à análise estatística nos valores médios das amostras antes da terapia ($0,5\pm 0,2$), havendo aumento constante das médias durante os momentos subsequentes ao tratamento.

TABELA 3 – Média e desvio-padrão referentes às variáveis proteínas totais, albumina, globulina e relação albumina/globulina segundo momento

Variável				
Momento	Proteínas Totais	Albumina	Globulina	Relação globulina/albumina
M0	9,5±1,6A	3,2±0,6A	6,3±1,6A	0,5±0,2C
M1	8,8±1,6A	3,3±0,5A	5,6±1,5A	0,6±0,2C
M2	8,0±1,2B	3,2±0,4A	4,9±1,2B	0,7±0,2BC
M3	7,6±0,9BC	3,2±0,4A	4,5±0,9BC	0,7±0,2AB
M4	7,1±0,7C	3,2±0,4A	3,9±0,6C	0,8±0,1A
M5	7,0±0,7C	3,1±0,3A	3,9±0,8C	0,8±0,2AB
M6	7,1±0,9C	3,2±0,3A	3,8±0,9C	0,8±0,2A

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

DISCUSSÃO

Durante décadas, o controle do reservatório canino através da eutanásia dos animais soropositivos, vem sendo realizado e atualmente bastante discutido. Resultados insignificantes na redução da prevalência da leishmaniose canina e humana são descritos (DYE, C. 1996; DIETZE et al., 1997; COSTA, 2001; COURTENAY et al., 2002). De acordo com a maioria dos autores, a dificuldade dos métodos diagnósticos em detectar a doença em animais assintomáticos, a presença de outros reservatórios, a demora entre a coleta e a eliminação dos cães doentes, bem como a recusa da população a aceitar esta última medida, são apontados como fatores principais para o insucesso do controle da doença. Por outro lado, verifica-se também que as medidas mesmo quando bem utilizadas, são autolimitantes, não reduzindo a prevalência canina dado à alta taxa de reposição desta população (CAMARGO-NEVES, 2004).

Sem dúvida a recusa por parte dos proprietários em entregar o animal, que muitas vezes se apresenta de forma assintomática, para realizar eutanásia, e que exerce um papel social e afetivo dentro das famílias, faz com que a OMS (Organização Mundial de Saúde) reconheça as limitações desta medida. Assim, nos países subdesenvolvidos a

eutanásia se reserva para animais sintomáticos, com recidivas, e quando o proprietário faz a opção por esta medida.

Várias pesquisas no Velho Mundo (DELGADO, 2000; LAMOTHE, 2001; OLIVA et al., 1995) e no Brasil (RIBEIRO et al., 2004; VEADO et al., 2003), têm demonstrado a eficácia da anfotericina b na população canina.

A melhora clínica verificada durante o tratamento, vai ao encontro da pesquisa realizada por LAMOTHE (1997); que evidenciou melhora em 80% dos animais tratados com anfotericina b; DELGADO (2000) que obteve 95% de melhora clínica; e LAMOTHE (2001) com 89% de melhora clínica. A ausência de sinais clínicos poderia diminuir a infecciosidade para flebotomíneos conforme os trabalhos de TRAVI et al. (2001) e COUTENAY (2002), que trabalharam com xenodiagnóstico.

A recidiva do quadro, que foi verificada em dois animais, indica uma ineficiente resposta terapêutica, ou uma deficiente resposta imune celular. Alguns autores (PINELLI, 1999; FERRER, 2002) apontam que o sucesso do tratamento está diretamente ligado à recuperação da resposta imune celular com supressão da resposta humoral, associado à produção de citocinas. Segundo CHIA e Mc MANUS (1990), a anfotericina b pode estimular a produção de TNF α e auxiliar na resposta imune celular. FERRER (2002), refere que além da imunocompetência individual, o número de parasitos inoculados pode interferir no restabelecimento da resposta imune e no sucesso da terapia. Mesmo que a prevenção através de colares repelentes tenha sido utilizada, a possibilidade de reinfecções não pode ser descartada.

Recidiva do quadro clínico também é referido em outras pesquisas (LAMOTHE, 1997; DELGADO, 2000; OLIVA et al., 1995).

A reativação da doença ocorreu após o sucesso da terapia convencional no homem (MAROVICH et al., 2001).

O protocolo instituído promoveu soroconversão em 55% dos animais. Os animais foram considerados suspeitos quando estes apresentaram resultados “border line” de densidade óptica. Segundo FERRER et al. (1995), a avaliação da resposta imune é baseada principalmente na presença de anticorpos anti-leishmania e no proteinograma. Tem sido bem demonstrado que os títulos de anticorpos, está correlacionado com a severidade dos sinais clínicos (FERRER et al., 1995). Segundo o autor, após a terapia se observa uma diminuição lenta dos títulos de anticorpos e que muitos cães ainda permanecem soropositivos, mesmo após a cura clínica. A avaliação

da resposta terapêutica obtida pela normalização do proteinograma e pela diminuição dos títulos de anticorpos são indicadores da boa resposta e prognóstico favorável.

BOGDAN et al. (2000), apontou a persistência da leishmania em fibroblastos em linfonodos, e que mesmo em estado de latência, poderiam constantemente estimular uma resposta imune com títulos de anticorpos mesmo após o tratamento.

Por ser uma doença caracterizada pelo comprometimento de células do sistema macrofagocitário, o encontro de parasitos em órgãos linfóides, em especial nos linfonodos, ou alterações da celularidade, são esperados em animais infectados.

No presente estudo, a ausência de parasitos no linfonodo, que foi verificado em 70% dos animais, demonstra o potente efeito leishmanicida da droga.

Segundo PINELLI et al. (1999), após a terapia, a diminuição dos níveis de anticorpos séricos e conseqüentemente a redução da resposta imune humoral, verificado no teste de ELISA e do proteinograma, pode contribuir para tal ausência.

A disproteinemia, conseqüente a uma hiperproteinemia associada a hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (BANETH, 1998), também foi verificada no nosso estudo, com os maiores valores registrados nos cães sintomáticos.

A diminuição da concentração sérica de albumina, verificada normalmente em animais infectados (FERRER, 1999; GENARO, 2003; SLAPENDELL et al., 1999), não foi observada neste estudo, sugerindo o não comprometimento hepático no que tange a produção de albumina ou renal quanto à perda de proteína urinária. Assim, ficou evidenciado que as alterações verificadas na concentração sérica de proteína total, estaria mais relacionada com a globulinemia.

Durante o tratamento, observou uma diminuição estatisticamente significativa progressiva durante os momentos na concentração sérica de proteína total, que estava associada à diminuição dos níveis de globulina. Conforme já descrito por FERRER, (1995), a diminuição da resposta imune humoral, verificada pela diminuição dos títulos de anticorpos, é acompanhada pela recuperação do proteinograma e melhora do quadro clínico. A inversão da relação albumina / globulina, assinalada por RIBEIRO, et al. (2004), se mostra um bom parâmetro para avaliar a condição clínica, bem como o sucesso da terapia. A diminuição significativa na relação albumina / globulina detectada antes do tratamento, recuperou aos padrões de normalidade nos momentos de observação. Todos os animais que apresentaram os menores valores na relação foram sintomáticos para o mesmo momento, indicando boa correlação com a gravidade do quadro.

A infecciosidade dos animais utilizando a pesquisa de parasitas na pele pela IHQ, também pode ser correlacionada com os valores obtidos da relação albumina / globulina (RIBEIRO et al., 2004). Tal correlação também foi evidenciada no nosso estudo, onde 87,5% dos animais positivos na IHQ apresentaram baixos valores na relação.

Observou diminuição estatisticamente significativa da positividade na IHQ de pele, sendo que dos 17 animais que terminaram o estudo, somente em um (5,88%) foram identificadas formas parasitárias pelos exames utilizados. A positividade da pele, também pôde ser correlacionada com a sintomatologia clínica, quando dos animais positivos pela IHQ antes da terapia, 87,5% eram sintomáticos no mesmo momento. Esses resultados corroboram com os estudos de TRAVI et al. (2001) que também observaram através de xenodiagnóstico grande infecciosidade para flebotomíneos nos animais sintomáticos e nenhum grau de infecciosidade nos animais assintomáticos.

Não foi registrado em nenhum dos casos de cães submetidos a este protocolo, dentro dos cuidados que foram utilizados, que tenha havido a ocorrência na mesma residência de um caso humano de Leishmaniose Visceral.



A- Manifestação clínica da Leishmaniose visceral: Atrofia de musculatura temporal e mastigatória e blefarite, antes da terapia; B- Remissão clínica após terapia

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais empregadas, pôde-se concluir que: o protocolo terapêutico promoveu remissão total dos sinais clínicos em 75% dos animais; houve soroconversão pós-tratamento em 55% dos animais; os valores do proteinograma foram restabelecidos aos parâmetros de normalidade; e o efeito leishmanicida da terapia foi

comprovado na ausência de parasitos no exame citopatológico de aspirado de linfonodo e na imunoistoquímica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann. Trop. Méd. Parasitol.**, v.88, n.2, p.371-378, 1994.
- BANETH, G. et al. Allopurinol treatment diminishes the infectivity of dogs leishmaniasis to *Lutzomyia longipalpis* sand flies. **Isr. Vet. Med. Assoc.**, v.56, n.2, p.55-60, 2001.
- BANETH, G. A review of the treatment of canine leishmaniasis. In: **International Canine Leishmaniasis Forum**, 2., 2002., Proceedings...Sevilla, Spain, 2002.p.7-14.
- BENNETT, J.E.; Fármacos antimicrobianos: fármacos antifúngicos. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: MacGraw Hill, 1996. p.863-875.
- BOGDAN, C. et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **J. Exp. Med.** v.191, n.12, p. 2121-2130, 2000.
- CAMARGO-NEVES, V.L.F. Aspectos Epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, Brasil. 2004. 225 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – USP.
- CHIA, J.K.S.; MCMANUS, E.J. *In vitro* tumor necrosis factor induction assay for analysis of febrile toxicity associated with amphotericin B preparations. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.34, p.906-908, 1990.
- COSTA, C.H.N. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.34, n.2, p.223-228, 2001.
- COURTENAY, O. et al.. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control Visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect. Dis.**, v.186, n.9, p.1314-1320, 2002.
- COWELL, R.L.; TYLER, R.D. **Diagnostic cytology of the dog and cat**. 3 ed. Gloeta: American Veterinary Publications, 1989, p.1-260.
- DELGADO, C.; SALCEDO, A. Valoracion Del tratamiento com anfotericina B wn 67 casos de leishmaniose canina. **Congresso Nacional da AVEPA**, 35., 2000, Madrid. **Proceedings**...Madrid, 2000. p.337.
- DENEROLLE, P. Leishmaniose canine: difficulté du diagnostic et du traitement. **Prat. Med. Chir. Anim. Cie.**, v.31, p.137-145, 1996.
- DIETZE, R. et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v.25, p.1240-1242, 1997.
- DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p.125-130, 1996.
- FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **International Canine Leishmaniasis Forum**, 1999, Barcelona, Spain. **Proceedings**...Barcelona, 1999. p.6-10.
- FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Rec.**, v.136, p.514-516, 1995.
- FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. **Kirk's Current Veterinary Therapy XI**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992, p.266-270.
- FERRER, L. Canine Leishmaniosis: evaluation of the immunocompromised patient. In: **WSAVA Congress Choose**, 8, 2002, Granada. **Proceedings**...Granada, 2002. p.78-95.

- FERRER, L. The Patology of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution, **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**, Sevilla, Spain – 2002.
- FISHER, L.D., BELLE, G.V. **Biostatistics: a methodology for the health sciences**. New York: Wiley-interscience, 1993. 991p.
- FONDATI, A.; FONDEVILA, D. Dermatological aspects of canine leishmaniasis: clinical and histopathological cases. **International Congress on Canine Leishmaniasis**, 2004, Itália. **Proceedings...Itália**, 2004. p.36-40.
- GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. 202f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.7, p.338-349, 2004.
- GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: **International Canine Leishmaniasis Forum**, 2002, Sevilla, Spain. **Proceedings...Sevilla**, Spain, 2002. p.7-14.
- KOUTINAS, A.; SARIDOMICHELAKIS, M. Clinical Aspects of canine leishmaniasis in Greece. **International Congress on Canine Leishmaniasis**, 2004, Itália. **Proceedings...Itália** 2004. p.28-34.
- LAMOTHE, J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. **J. Small Anim. Pract.**, v.42, p.170-175, 2001.
- LAMOTHE, J. La leishmaniose canine: limites diagnostiques de la sérologie á partir de deux câs cliniques. **Prat. Med. Chir. Anim. Cie.**, v.37, p.55-59, 2002.
- LAMOTHE, J. Essai de traitement de la leishmaniose canine par l'amphotéricine B, **Prat. Méd. Chir. Anim. Cie.**, v.32, p.133-141, 1997.
- LIMA, V. M. F. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, n.4, p.485-489, 2003.
- Mc CURNIN; POFFENBAGER, E.M. **Small animal physical diagnosis and clinical procedures**. Phyladelphia: W.B. Saunders, 1991.
- MANCIANTI, F. et al. Studies on canine control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.82, p.566-567, 1988.
- MARMER D.J. et al. Ketoconazole, amphotericin B, and amphotericin B metil ester: Comparative *in vitro* and *in vivo* toxicological effects on neutrophil function. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 20, p. 660-665, 1981.
- MAROVICH, M.A. et al. Leishmaniasis Recidivans. Recurrence after 43 Years: A Clinical and Immunologic Report after Successful Treatment. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p.1076–1079, 2001.
- NAIR, M.P.; SCHWARTZ, S.A. Immunomodulatory effects of amphotericin B on cellular toxicity of normal human lymphocytes. **Cell. Immunol.**, v.70, p. 287-300, 1982.
- NETO, V.A. In: **Antibióticos na prática médica**, 1985.
- NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**. v.9, n.2, p.16-24, 1999.
- OLIVA, G.; GRADONI, L.; CIARAMELLA, P. et al. Activity of liposomal amphotericine B in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*, **J. Antimicrob. Chemother.**, v.36, p.1013-1019, 1995.
- PERFECT JR, GRANGER DL, DURACK DT. Effects of antifungal agents and gamma-interferon on macrophage cytotoxicity for fungi and tumor cells. **J. Infect. Dis.**, v.156, p.316-323, 1987.

- PINELLI, E., RUTTEN, V.P.M.G., RUITENBERG, E.J. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In: **International Canine Leishmaniasis Forum**, 1999, Barcelona, Spain. **Proceedings...Barcelona, Spain, 1999**. p. 60-64.
- RANG, H.P.; DALE, M.; RITTER, J.M. Fármacos antifúngicos. In: **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001, p.605-608.
- RIBEIRO, V.M. et al. $\beta^2 \gamma$ – Globulin Fractions in Dogs infected with *Leishmania infantum* and cutaneous infectiousness using an immunohistochemical method. **International Congress on Canine Leishmaniasis**, 2004, Itália. **Proceedings: Itália, 2004**.
- RIBEIRO, V.M. et al. Padrão histológico e infectividade da pele de cães com leishmaniose visceral antes e durante o tratamento com antimoniato de n-metil glucamina e allopurinol. **XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, VI Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses**, Programa e Resumos, Uberaba-MG, 2002.
- SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Fungal skin diseases. In: Miller, W.H. **Small animal dermatology**. Philadelphia: Saunders, 2001, p.337-442.
- SLAPPENDEL, R.J.; TESKE, E. A review of canine leishmaniasis presenting outside endemic areas. In: *Canine Leishmaniasis, An update*. **Canine Leishmaniasis Forum**, 1999, Barcelona. **Proceedings...Barcelona**: Ed. R. Killick- Kendrick. 1999. p.54-59.
- TAFURI, W.L.; MICHALICK, M.S.M.; RIBEIRO, V.M. Avaliação clínica, sorológica, e infectividade da pele em um cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, antes e durante tratamento com antimônio e allopurinol. In: **Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, 20, Águas de Lindóia. Anais...Águas de Lindóia, 1999. p.27.
- TAVARES, W. Poliênicos e outros antibióticos antifúngicos. In: **Manual de antibióticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p.747-764.
- TRAVI, B.L. et al. Canine Visceral Leishmaniasis In Colombia: Relationship Between Clinical And Parasitologic Status And Infectivity For Sand Flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.64, n.3-4, p.119–124, 2001.
- VEADO, J.C.C. et al. Associação de cetanoálogos ao tratamento da leishmaniose visceral canina com doses elevadas de Anfotericina B. **Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA**, 24., 2003, Belo Horizonte. Anais...Belo Horizonte, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Leishmaniasis. **Technical Report Series**, v.793, p.50-52, 1990.
- YAMAGUCHI, H.; ABE, S.; TOKUDA, Y. Immunomodulating activity of antifungal drugs. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v.685, p.447-457, 1993.

11. APÊNDICE

QUADRO 6 – Valores de creatinina sérica obtidos em cada momento.

Animais	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	1	1,7	2,5	1,9	1,6	1,2	1,3
2	1,5	2	2,8	2,5	2,2	obito	obito
3	1,3	1,9	2,3	2,2	1,8	1,4	1
4	1,5	1,7	2,5	3,1	2	1,5	1,4
5	1,4	1,9	2,3	2,8	2	1,6	obito
6	0,6	1,6	1,9	2,5	1,8	1	0,9
7	1,3	2,5	3,9	4,5	4,0	obito	obito
8	0,7	1,6	1,9	1,9	1,8	1,1	0,9
9	0,5	1,3	1,9	1,9	2,4	1,5	0,9
10	1,3	2	2,1	2,7	2	1,3	1,5
11	1,2	1,9	1,8	2,1	1,7	0,9	1,2
12	1	2,1	1,5	1,7	1,6	1,2	0,9
13	0,9	1,7	1,9	1,6	1,2	0,9	0,5
14	1	1,7	2,5	3,9	3	1,6	1,2
15	1	1,9	2,1	2	1,5	1,1	1,2
16	0,7	1,9	2,8	2,4	1,8	1,3	1,2
17	0,9	1,7	2	1,8	2,1	1,3	1
18	1	1,8	2,7	2,9	2	1,2	1,5
19	1,4	1,8	2,4	2,4	1,7	1,2	1,3
20	1,2	1,8	2,6	2	1,8	1,2	0,6

QUADRO 7 – Valores de uréia sérica obtidos em cada momento.

Animais	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	32	70	125	98	69	43	50
2	40	96	170	174	148	obito	obito
3	18	73	101	122	120	65	33
4	42	70	95	137	108	37	18
5	34	81	109	179	148	60	obito
6	23	70	79	129	142	69	52
7	55	172	202	221	200	obito	obito
8	43	85	102	112	89	34	39
9	22	48	87	107	124	66	37
10	43	96	154	177	189	49	37
11	37	81	79	83	71	37	55
12	32	82	57	79	69	39	43
13	21	69	78	70	37	29	39
14	34	60	68	129	111	69	37
15	37	79	97	115	101	66	58
16	18	54	87	129	101	60	37
17	22	57	93	90	134	50	47
18	29	98	119	220	182	57	49
19	40	73	99	115	101	57	33
20	37	77	103	85	86	51	29

QUADRO 8 – Valores de alanina aminotransferase sérica obtidos em cada momento.

Animais	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	25	29	89	66	47	50	26
2	30	74	87	60	35	obito	obito
3	23	44	47	89	50	26	32
4	34	25	45	19	27	29	20
5	18	88	47	103	79	123	obito
6	34	62	60	51	57	61	65
7	39	74	88	139	128	obito	obito
8	18	58	63	67	37	30	38
9	19	32	65	54	39	27	29
10	27	47	74	101	78	54	49
11	17	34	78	75	60	42	29
12	27	60	58	78	57	40	31
13	27	38	30	40	35	62	30
14	28	32	35	37	33	39	29
15	39	42	53	60	49	54	50
16	19	48	53	33	27	53	47
17	18	65	132	121	101	74	61
18	15	37	45	40	37	62	55
19	31	42	69	60	73	32	37
20	12	47	63	58	55	30	31

QUADRO 9 – Valores de aspartato aminotransferase sérica obtidos em cada momento.

Animais	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	38	53	101	51	28	37	29
2	17	60	93	43	39	obito	obito
3	32	70	89	127	64	31	19
4	16	19	50	41	33	47	31
5	33	77	49	89	81	118	obito
6	17	50	61	27	37	29	27
7	25	101	127	108	100	obito	obito
8	29	67	59	57	74	33	19
9	29	37	74	47	48	33	30
10	18	31	59	127	101	78	54
11	25	55	60	69	34	33	30
12	32	58	55	54	49	59	50
13	42	40	27	49	40	29	18
14	20	27	42	64	60	45	40
15	18	38	32	47	69	50	53
16	27	101	118	77	24	28	39
17	30	50	99	91	107	63	34
18	34	29	47	40	89	37	39
19	24	37	74	49	52	28	29
20	24	38	44	33	27	34	27

QUADRO 10 – Valores de Proteínas totais sérica obtidos em cada momento.

Animais	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	7,1	7	6,8	6,9	7	6,9	6,8
2	11,2	10,1	9,5	10	8,5	obito	obito
3	8,9	8,7	8	7,2	7	6,9	7
4	11	10,9	9,9	8,4	7,9	7,3	7
5	11,9	12,4	10,3	8,8	8,1	8,9	obito
6	8	7,9	7,2	7,1	7,2	7	6,9
7	8,8	8,9	8,8	8,6	obito	obito	obito
8	8,1	6,9	6,8	6,9	6,5	7	6,9
9	7,9	7,2	7,3	7,1	7,2	7	6,9
10	10,9	10,1	8,9	7,9	7,2	7,4	9,9
11	10,9	10,1	8,3	7,9	8	7,2	7,4
12	6,9	6,1	5,8	6,2	6,4	6,7	6,2
13	7,9	7,2	7,3	7	6,2	6	6
14	9,7	7,9	7,1	7	7	5,3	6,2
15	8,7	8,5	7,9	7,8	7,2	7,6	7,5
16	10,1	9,9	7,7	7,8	6,9	6,7	6,8
17	10,1	8,7	7,2	7,3	6,1	6,4	6
18	9,1	8,7	8	6,9	6	6,9	8,3
19	12	9,9	8,1	7,8	7	7,1	6,9
20	10,5	9,7	9,4	7,7	7,9	7,6	7,7

QUADRO 11 – Valores de albumina sérica obtidos em cada momento.

Animais	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	3,1	3,4	3,2	3,5	3,4	3,3	3,5
2	3,2	3,5	3,6	4,3	4,2	obito	obito
3	3,8	4	3,9	3,2	3,4	3,5	3,4
4	3,5	3,9	3,6	3,7	3,7	3,6	3,4
5	3,9	4	2,7	3,8	3,1	3,2	obito
6	3,4	3,6	2,9	3,4	3,4	3,2	3,4
7	3,8	3,6	3,6	3	obito	obito	obito
8	3,7	3,4	3,3	3,4	3,2	3,5	3,5
9	2,9	3,2	3	3,3	3,4	3	3,3
10	2,9	3,1	3,5	3,4	3	2,9	3
11	3,9	3,8	3	3,2	3,5	3,1	3,4
12	3	3,5	3,4	3,3	3,4	3,4	3,2
13	2,9	3,2	3	2,9	2,8	2,9	3
14	3,7	3	3	2,9	3,2	3,2	3,2
15	3,5	3,7	3,9	3,2	3,5	3	3,2
16	3,8	3,2	3	3,2	3,4	3,3	3,3
17	1,9	2,9	3	2,9	2,4	2,8	2,7
18	2,5	2,7	3	3,1	2,8	2,4	2,8
19	1,9	2,2	2,1	2,2	2,8	2,6	2,5
20	3,4	2,9	2,8	2,9	2,8	2,8	3,4

QUADRO 12 – Valores de globulina sérica obtidos em cada momento.

Animais	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	4	3,6	3,6	3,4	3,6	3,6	3,3
2	7	6,6	5,9	5,7	4,3	obito	obito
3	6,1	4,7	4,1	4	3,6	3,4	3,6
4	7,5	7	6,6	5,7	4,2	3,7	3,6
5	8	8,4	7,6	5	5	6,7	obito
6	4,6	4,3	4,3	3,7	3,8	3,8	3,5
7	5	6,3	5,2	5,6	obito	obito	obito
8	5,4	3,5	3,5	3,5	3,3	3,5	3,5
9	5	4	4,3	3,8	3,8	4	3,6
10	8	7	5,4	4,5	4,2	4,5	6,9
11	7	6,3	5,3	4,7	4,5	4,1	4
12	3,9	3,6	2,4	2,8	3	3,3	3
13	5	4	4,3	4,1	3,4	3,1	3
14	6	4,9	4,1	4,1	3,8	2,7	3
15	5,2	4,8	4	4,6	3,7	4,6	4,3
16	6,3	6,7	4,7	4,6	3,5	3,4	3,5
17	8,2	5,8	4,2	4,4	3,7	3,6	3,3
18	6,6	6	5	3,8	3,2	3,5	5,5
19	10,1	7,7	6	6,6	4,2	3,5	3,4
20	7,1	6,8	6,6	4,8	5,1	4,8	4,3

QUADRO 13 – Valores da relação albumina / globulina sérica obtidos em cada momento.

Animais	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	0,7	0,9	0,8	1	0,9	0,9	1
2	0,4	0,5	0,6	0,7	0,9	obito	obito
3	0,6	0,8	0,9	0,8	0,9	1	0,9
4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,8	0,9	0,9
5	0,4	0,4	0,3	0,7	0,6	0,4	obito
6	0,7	0,8	0,6	0,9	0,8	0,8	0,9
7	0,7	0,5	0,6	0,5	obito	obito	obito
8	0,6	0,9	0,9	0,9	0,9	1	0,9
9	0,5	0,8	0,6	0,8	0,8	0,7	0,9
10	0,3	0,4	0,6	0,7	0,7	0,6	0,4
11	0,5	0,6	0,5	0,6	0,7	0,7	0,8
12	0,7	0,9	1,4	1,1	1,1	1	1
13	0,5	0,8	0,6	0,7	0,8	0,9	1
14	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	1
15	0,6	0,7	0,9	0,6	0,9	0,6	0,7
16	0,6	0,4	0,6	0,6	0,9	0,9	0,9
17	0,2	0,5	0,7	0,6	0,6	0,7	0,8
18	0,3	0,6	0,6	0,8	0,8	0,6	0,5
19	0,1	0,2	0,3	0,3	0,6	0,7	0,7
20	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,5	0,7

QUADRO 14 – Sinais clínicos presentes em vários momentos, descritos em forma de “score”.

Animais	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	2	2	2	1	1	1	1
2	3	3	2	2	1	obito	obito
3	2	2	1	1	1	1	1
4	3	3	3	2	1	1	1
5	3	3	2	1	1	1	obito
6	2	2	1	1	1	1	1
7	3	3	3	3	obito	obito	obito
8	2	2	1	1	1	1	1
9	3	1	1	1	1	1	1
10	3	3	1	1	1	1	3
11	3	3	1	1	1	1	1
12	2	1	1	1	1	1	1
13	3	2	1	1	1	1	1
14	3	2	1	1	1	1	1
15	2	1	1	1	1	1	1
16	2	1	1	1	1	1	1
17	3	3	2	2	1	1	1
18	3	2	1	1	1	1	3
19	3	2	1	2	1	1	1
20	2	2	1	1	1	1	1

QUADRO 15 – Valores ensaio de ELISA.

Animais	M0	M1
1	3	1
2	3	obito
3	3	1
4	3	1
5	3	obito
6	3	1
7	3	obito
8	3	1
9	3	1
10	3	3
11	3	1
12	3	1
13	3	1
14	3	1
15	3	2
16	3	2
17	3	1
18	3	3
19	3	3
20	3	3

QUADRO 16 – Valores IHQ.

Animais	M0	M1
1	1	1
2	2	obito
3	1	1
4	2	1
5	2	obito
6	1	1
7	1	obito
8	1	1
9	1	1
10	2	2
11	1	1
12	1	1
13	1	1
14	1	1
15	1	1
16	2	1
17	2	1
18	2	1
19	2	1
20	1	1

QUADRO 17 – Valores PAAF.

Animais	M0	M1	M2	M3
1	2	2	1	1
2	3	3	3	obito
3	2	1	1	1
4	3	3	2	1
5	3	3	2	obito
6	3	1	1	1
7	3	3	obito	obito
8	2	2	1	1
9	3	1	1	1
10	3	3	1	3
11	3	2	2	1
12	3	1	1	1
13	3	2	1	1
14	3	2	1	1
15	1	2	2	1
16	1	1	2	1
17	3	3	1	1
18	3	3	2	2
19	3	3	2	2
20	3	3	2	1