



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

MAYARA LARISSA DOS SANTOS RIBEIRO

**ACHADOS ELETROCARDIOGRÁFICOS E
ECOCARDIOGRÁFICOS EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *LEISHMANIA* SPP. SUBMETIDOS À
TERAPIA COM MILTEFOSINA**

Araçatuba

2022

MAYARA LARISSA DOS SANTOS RIBEIRO

**ACHADOS ELETROCARDIOGRÁFICOS E
ECOCARDIOGRÁFICOS EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *LEISHMANIA* SPP. SUBMETIDOS À
TERAPIA COM MILTEFOSINA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Patto dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Wagner Luis Ferreira

Araçatuba

2022

R484a

Ribeiro, Mayara Larissa dos Santos

Achados eletrocardiográficos e ecocardiográficos em cães naturalmente infectados por leishmania spp. submetidos à terapia com miltefosina. / Mayara Larissa dos Santos Ribeiro. -- Araçatuba, 2022
60 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientador: Paulo Sérgio Patto dos Santos

Coorientador: Wagner Luis Ferreira

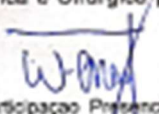
1. Antiprotozoário. 2. Eletrocardiograma. 3. Ecocardiograma. 4.
Leishmaniose visceral canina. I. Título.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ACHADOS ELETROCARDIOGRÁFICOS E ECOCARDIOGRÁFICOS EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR LEISHMANIA SPP. SUBMETIDOS À
TERAPIA COM MILTEFOSINA

AUTORA: MAYARA LARISSA DOS SANTOS RIBEIRO
ORIENTADOR: PAULO SERGIO PATTO DOS SANTOS
COORDENADOR: WAGNER LUIS FERREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP


Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI (Participação Presencial)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP


Prof. Dr. RODRIGO PREVEDELLO FRANCO (Participação Presencial)
Curso de Medicina Veterinária / Universidade de Marília - UNIMAR

Araçatuba, 05 de julho de 2022.

Ao meu avô, João Ribeiro (in memoriam), por me inspirar até hoje em sempre acreditar nos meus sonhos e nunca desistir de nada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora de Aparecida, por me concederem paz, saúde e força para continuar independente dos obstáculos.

Aos meus pais, Edivaldo e Mônica, pelo apoio incondicional, por nunca me deixarem desamparada independente das circunstâncias, por sempre estarem ao meu lado com todo seu apoio e amor e acima de tudo, se dedicando e se doando para eu alcançar e conquistar meus objetivos.

Ao meu marido, Henrique, por todo amor, dedicação e incentivo, por se manter incansavelmente ao meu lado, me inspirando sempre a seguir em frente, nunca me deixando desistir independente das dificuldades.

A minha irmã Mariana e minha avó Meida, por sempre estarem presentes em minha vida, torcendo junto comigo cada conquista.

Aos professores Paulo Patto e Wagner, me orientando com toda dedicação e ensino, obrigada por toda orientação e inspiração profissional e pessoal desde a graduação, residência e pós-graduação. Obrigada pela confiança em meu trabalho.

Ao professor Alex Nakamura, que puderam contribuir com na banca examinadora do exame de qualificação, agregando muito conhecimento.

A professora Kátia Bresciani, que contribuiu muito nas bancas do exame de qualificação e defesa, agregando muito conhecimento, mas acima de tudo, por todo em seu empenho em me ajudar, desde o começo da graduação, onde foi por ela que comecei a ter oportunidades na área da pesquisa veterinária e é minha fonte de inspiração sempre.

Ao professor Rodrigo Prevedello, pela imensa contribuição com o trabalho, por toda dedicação em me ajudar. Um exemplo de profissional e ser humano que é uma inspiração a ser seguida.

Ao professor Fábio Nogueira, por todo apoio e dedicação com o trabalho, um profissional que me inspirou na realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos Gabriel Caminha, Mariana Higino e Mariana Rocha, profissionais e seres humanos dedicados, na qual tive a oportunidade de trabalhar e sempre me deram força e inspiração.

A minha querida amiga Giovana Nunes, por me inspirar nesse mundo da pesquisa veterinária, sempre me apoiando e me ajudando a melhorar a cada dia.

As minhas queridas amigas/irmãs Débora Bruno, Lara Gabriele e Laura Luisa, por estarem sempre ao meu lado, independente das dificuldades ou da distância, torcendo e me dando força de forma incondicional.

Aos meus amigos de pós-graduação da equipe "Cardio do HV": Bruna Games e Guilherme Bispo.

A minha amiga e estagiária Polyana, obrigada por toda a dedicação e amor com a qual conduziu o projeto e no cuidado com os animais do estudo.

Aos estagiários Mariana Vealholi e Sháyder, por toda a ajuda e contribuição no início do estudo.

Ao querido amigo Marcel Gambim, com quem iniciei os aprendizados na cardiologia veterinária, que sempre foi minha inspiração profissional.

A minha amiga Carolina Barbosa, por toda a ajuda com a elaboração do projeto e também por todo o apoio e inspiração profissional que me proporciona sempre.

A Natália Camargo e as estagiárias da Equilíbrio Vet, por toda a ajuda com na fase de experimental do projeto.

A Ong e Canil Sagrado Coração de Jesus, ao Max e seus colaboradores, pela confiança a entregar seus cães para a realização do projeto, por toda a ajuda na execução e paciência durante toda a fase experimental.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba FMV – UNESP e ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), pela a oportunidade de concretizar esse sonho.

À Capes pela bolsa auxílio durante um período desse estudo, permitindo que o ensino no nosso país permaneça em expansão.

A todos vocês, meus **SINCEROS AGRADECIMENTOS!**

“As dificuldades preparam pessoas comuns para um destino extraordinário”.

MAYARA, L. S. R. **Achados eletrocardiográficos e ecocardiográficos em cães naturalmente infectados por *leishmania* spp. submetidos à terapia com miltefosina.** 2022. 60f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina é uma doença de caráter crônico, endêmica, multissistêmica e zoonótica. O cão infectado pode desenvolver sintomatologia variada, afetando vários sistemas como o cardiovascular. Assim, o presente estudo teve como objetivo identificar as principais alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. tratados com Miltefosina (Milteforan®). Foram utilizados 22 animais (n=22), sendo 13 fêmeas e 9 machos, todos sem raça definida, adultos, com pesos entre 6,4 a 15,1kg e positivos para *Leishmania* spp. Todos foram submetidos a exames eletrocardiográficos e ecocardiográficos e, posteriormente, divididos em 2 grupos: (1) grupo controle positivo (GC+), composto por 7 cães que receberam NaCl 0,9% na dose de 1 mL para cada 10 kg, uma vez ao dia durante 28 dias e; (2) grupo tratado (GT), composto por 15 cães que receberam tratamento com Miltefosina na dosagem de 2 mg/kg, uma vez ao dia durante 28 dias. Cães portadores de cardiopatias adquiridas ou congênitas foram excluídos. As avaliações cardiológicas foram realizadas em dois momentos (M1 e M2), sendo o M1 previamente ao tratamento com Miltefosina e o M2 imediatamente após o término dos 28 dias da terapia. A partir dos resultados do presente trabalho, foi possível demonstrar a ausência de interferências nas variáveis eletrocardiográficas quando comparadas aos momentos e grupos estudados. Contudo, no estudo ecocardiográfico foi observada diferença significativa na fração de ejeção pelo método de Simpson (p-valor=0.0000007) e no movimento anular sistólico mitral (p-valor=0.0353891) entre os momentos no GT, com aumento dessas variáveis, demonstrando uma melhora pós tratamento. Conclui-se, portanto, que os cães portadores de leishmaniose visceral apresentaram alterações na função sistólica e diastólica ventricular esquerda, com melhora significativa da função sistólica, após terapia a base de Miltefosina.

Palavras-chave: antiprotozoário, eletrocardiograma, ecocardiograma, leishmaniose visceral canina.

MAYARA, L. S. R. **Electrocardiographic and echocardiographic findings in dogs naturally infected with Leishmania spp. undergoing therapy with miltefosine.** 2022. 60f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis is a long-term, endemic, systemic and zoonotic disease. The infected dog can develop varied symptoms, affecting several systems such as the cardiovascular system. Thus, the present study aimed to identify the main electrocardiographic and echocardiographic changes in dogs naturally infected by *Leishmania* spp. treated with Miltefosine (Milteforan®). Twenty-two animals (n=22) were used, 13 females and 9 males, all mixed breed, adults, weighing between 6.4 and 15.1 kg and positive for *Leishmania* spp. All were submitted to electrocardiographic and echocardiographic examinations and, subsequently, divided into 2 groups: (1) positive control group (GC+), composed of 7 dogs that received 0.9% NaCl at a dose of 1 mL for every 10 kg, once a day for 28 days and; (2) treated group (TG), composed of 15 dogs that received treatment with Miltefosine at a dosage of 2 mg/kg, once a day for 28 days. Dogs with acquired or congenital heart disease were excluded. Cardiological assessments were performed in two moments (M1 and M2), being M1 prior to treatment with Miltefosine and M2 immediately after the end of the 28 days of therapy. Based on the results of the present study, it was possible to demonstrate the absence of interference in the electrocardiographic variables when compared to the moments and groups studied. However, in the echocardiographic study, a significant difference was observed in the ejection fraction by Simpson's method (p-value=0.0000007) and in the mitral systolic annular motion (p-value=0.0353891) between the moments in the GT, with an increase in these variables, demonstrating a improvement after treatment. It is concluded, therefore, that dogs with visceral leishmaniasis showed changes in left ventricular systolic and diastolic function, with significant improvement in systolic function, after Miltefosine-based therapy.

Keywords: Antiprotozoal, Electrocardiogram, Echocardiogram, Canine Visceral Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - (A) Imagens do canil experimental, demonstrando a separação dos animais por baias..... 27
- Figura 2** - (A) Posicionamento dos animais para exame eletrocardiográfico. (B) Traçado eletrocardiográfico demonstrando derivações de membros bipolares, monopolares e pré-cordiais. 33
- Figura 3** - Imagens ecocardiográficas bidimensionais (2B) obtidas na janela paraesternal direita, eixo longitudinal (A) e eixo transversal (B, C e D). (A) Modo bidimensional eixo longitudinal evidenciando as 4 câmaras. (B) Modo bidimensional do ventrículo esquerdo em plano cordal. (C) Modo bidimensional ao nível da bifurcação da artéria pulmonar. (D) Fluxo da via de saída do ventrículo direito, artéria pulmonar evidenciado por meio do doppler pulsado..... 35
- Figura 4** - Imagens ecocardiográficas bidimensionais (2B) apicais obtidas na janela paraesternal esquerda. (A) Imagem apical 4 câmaras. (B) Fluxo na via de saída do ventrículo esquerdo, espectro aórtico obtido pelo doppler pulsado. (C) Imagem apical 4 câmaras evidenciando a mensuração da Fração de Ejeção pelo método de Simpson modificado..... 36
- Figura 5** - Imagens ecocardiográficas bidimensionais (2B) apicais obtidas na janela paraesternal esquerda. (A) Imagem apical 4 câmaras evidenciando o fluxo na via de entrada do ventrículo esquerdo (onda E e onda A) obtido por meio do doppler pulsado. Imagem apical 4 câmaras demonstrando as velocidades de movimentação miocárdica diastólicas (onda E' e A') e sistólica (Onda S') do anel mitral parietal (B) e do anel mitral septal (C) obtidas por meio do doppler tecidual. (D) Imagem apical 5 câmaras demonstrando o tempo de relaxamento isovolumétrico.....37

Figura 6 - Imagens ecocardiográficas bidimensionais (2B) apicais obtidas na janela paraesternal esquerda. (A) Modo M posicionado no anel mitral septal para obtenção da excursão sistólica do anel mitral septal na imagem apical 4 câmaras. (B) Modo M posicionado no anel tricúspide parietal para obtenção da excursão sistólica do anel tricúspide na imagem apical 4 câmaras.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sinais clínicos dermatológicos, sistêmicos e oftálmicos associados a LV classificados com escore de 0 a 2: Os parâmetros foram classificados com os escores 0 (ausente), 1 (leve) e 2 (severo).

Tabela 2 - Sinais clínicos associados a LV classificados com escore de 0 e 1.

Tabela 3 - Sinais clínicos associados a LV classificados com escore de 0 e 3: Os parâmetros foram classificados com os escores 0 (ausente); 1 (leve); 2 (moderado); 3 (severo).

Tabela 4 - Variáveis laboratoriais hematológicas e de bioquímica sérica (média \pm desvio padrão) de cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Tabela 5 - Variáveis laboratoriais de qPCR (medula óssea e linfonodo) e o escore clínico (média \pm desvio padrão) de cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Tabela 6 - Variáveis de escore clínico (média) de cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Tabela 7 - Variáveis eletrocardiográficas (média \pm desvio padrão) de cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Tabela 8 - Média e desvio padrão das variáveis ecocardiográficas de função sistólica em cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os

que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Tabela 9 - Média e desvio padrão das variáveis ecocardiográficas de função diastólica em cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Tabela 10 - Tabela 10. Variáveis hemodinâmicas dos fluxos pulmonar e aórtico, valores do diâmetro atrial esquerdo e aórtico e de função sistólica ventricular (média \pm desvio padrão) de cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

LISTA DE ABREVIATURAS

Alb albumina

ALT alanina amino transferase

ANOVA análise de variância

aVF derivação unipolar membro pélvico esquerdo

aVL derivação unipolar membro torácico esquerdo

aVR derivação unipolar membro torácico direito

bpm batimentos por minuto

CDC centro de controle de doenças

Cret creatinina

°C graus celsius

D0 dia 0

D14 dia 14

D28 dia 28

DIVEd diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole

DIVEs diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole

DP desvio padrão

ECG eletrocardiograma

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA ensaio de imunoabsorção ligado a enzimas

FA fosfatase alcalina

FC frequência cardíaca

FEC fração de encurtamento

FEJ fração de ejeção

g/dL gramas por decilitro

GC grupo controle

Glob globulina

GT grupo tratamento

HAS hipertensão arterial sistêmica

He hemácias

Hg hemoglobina

Ht hematócrito

Kg kilo

Leuc leucócitos

LV leishmaniose visceral

LVC leishmaniose visceral canina

M1 momento 1

M2 momento 2

M2B modo bidimensional

MAPA ministério da agricultura pecuária e abastecimento

MAPSE excursão sistólica do plano anular mitral

mg/dL miligramas por decilitro

MHz megahertz

mL ml por litro

mm milímetros

Modo M modo movimento

mrpm movimentos respiratórios por minuto

NaCL cloreto de sódio

OD olho direito

OE olho esquerdo

OMS organização mundial da saúde

ONGs organizações não governamentais

pPCR Linf reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo de medula linfonodo

pPCR MO reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo de medula óssea

PR Intervalo PR

PT proteína total

ST Segmento ST

TAPSE excursão sistólica do plano anular tricúspide

TRIV tempo de relaxamento isovolumétrico

U/L unidades internacionais por litro

V1 derivação pré-cordial 1

V2 derivação pré-cordial 2

V3 derivação pré-cordial 3

V4 derivação pré-cordial 4

V5 derivação pré-cordial 5

V6 derivação pré-cordial 6

VM velocidade máxima

µl microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1 Animais Experimentais.....	24
2.2 Consentimento do Tutor	24
2.3 Critérios de Inclusão.....	24
2.4 Critérios de Exclusão.....	25
2.5 Locais do Procedimento Experimental.....	25
2.6 Aclimação.....	25
2.7 Origem e Destino dos Animais	27
2.8 Tratamentos Experimentais.....	27
2.8.1 Grupo Tratado.....	27
2.8.2 Grupo Controle Positivo.....	28
2.9 Tratamentos Concomitantes	28
2.10 Avaliação Clínica	28
2.11 Parâmetros Laboratoriais	30
2.11.1 Hemograma e Bioquímica Sérica	30
2.11.2 Detecção Molecular	31
2.12 Eletrocardiograma	31
2.13 Ecocardiograma.....	33
2.14 Análise Estatística	38
3 RESULTADOS.....	38
4 DISCUSSÃO	48
5 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença grave e considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo uma endemia re-emergente, negligenciada e prioritária no mundo (BRIFFOD, 2011). A leishmaniose visceral canina (LVC), historicamente, proporcionou transtornos endêmicos aos países do Velho mundo (Europa, Ásia e África) recebendo a denominação indiana Kala-azar (febre negra) referente ao aspecto ulcerativo das lesões cutâneas formadas (CORREA, 1992). Atualmente, a LV aflige populações dos cinco continentes, sendo 88 países localizados em regiões tropicais e subtropicais (DESJEUX, 2004).

Inicialmente, era uma zoonose caracterizada como eminentemente rural, mas recentemente já se encontra em áreas urbanas, causando grave problema de saúde pública no Brasil e em outras regiões geográficas, como o continente americano. É endêmica em 62 países, com um total de 200 milhões de pessoas em risco, e cerca de 500.000 novos casos por ano em todo o mundo, sendo que 90% dos casos ocorre na Índia, Bangladesh, Sudão e Brasil (MANNA et.al., 2009).

Alguns estudos descrevem o comprometimento cardíaco, em seres humanos (PUERTO-ALONSO et al., 2006 e SILVA et al. 2007) quanto em cães (ZABALA et al., 2005; TORRENT et al., 2005; FERRARI et al., 2006; LÓPEZ-PEÑA et al. 2009, ROSA et al., 2012), no entanto, os estudos consistem em relatos de casos individuais, sendo poucos os ensaios que avaliaram um número maior de seres humanos (MORAIS et al., 1988) ou cães (ALVES et al., 2010) naturalmente acometidos pela doença.

Cães com LV desempenham papel crucial na perpetuação do ciclo rural e urbano da doença, propiciando não apenas prejuízos a sua própria espécie, mas também favorecendo a infecção humana. Desta forma, faz-se necessário conhecer o comportamento clínico desta enfermidade, especialmente em seus aspectos cardiovasculares, por meio de exames complementares como a eletrocardiografia, ecocardiografia e histopatologia, visando auxiliar o diagnóstico precoce e melhorar o prognóstico dos pacientes acometidos

(TORRENT et al., 2005; ZABALA et al., 2005; FERRARI et al., 2006; PUERTO-ALONSO et al., 2006; LÓPEZ-PEÑA et al., 2009; SILVA et al., 2009; ROSA, 2012). Neste aspecto, o comportamento similar da infecção observado entre humanos e cães, faz deste último um excelente modelo experimental que possibilita a busca por maiores informações.

O eletrocardiograma constitui método de diagnóstico complementar importante na LV, visto que, estudo relatou a ocorrência de *sinus arrest*, bloqueio de ramo direito, complexos atriais prematuros e maior duração da onda P e complexo QRS (SOUSA et al. 2013) em cães com LV. Adicionalmente, relatos isolados de cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* descreveram ocorrência de bloqueio atrioventricular de primeiro-grau com infradesnivelamento de ST (TORRENT et al. 2005) e menor amplitude do complexo QRS (LOPEZ-PEÑA et al. 2009) nestes animais.

O ecocardiograma é utilizado para se obter o diagnóstico definitivo das principais doenças congênitas e adquiridas do coração, bem como alterações cardíacas secundárias a diversas doenças sistêmicas, principalmente aquelas de origem infecciosa como a LVC. Quando não é possível a realização de um exame macroscópico e histopatológico das alterações cardíacas, o ecocardiograma tem papel fundamental na determinação de tamanho de câmaras cardíacas, massa ventricular, função ventricular, avaliação hemodinâmica e quantificação de valvopatias (OTTO; CHWAEGLER; FREEMAN, 2012).

A importância dos achados dos exames complementares, tais como a eletrocardiografia e a ecocardiografia em cães naturalmente acometidos por LVC submetidos ao tratamento com a Miltefosina ainda não foi avaliada, e permanece incerto se o dano cardíaco observado pelo estudo histopatológico nesses animais poderia ter sido identificado por tais exames subsidiários e avaliar se há impacto dessas alterações após a terapia. A incorporação desses métodos diagnósticos aos casos de LVC, reforça os achados já evidenciados de lesões cardíacas agregando confiabilidade aos resultados.

A terapia com miltefosina representa uma boa opção de protocolo terapêutico na LVC, controlando e retardando a progressão da doença. (MANNA. et al, 2009). Assim, no presente trabalho, foram investigadas e descritas as principais alterações clínicas, eletrocardiográficas e

ecocardiográficas de cães parasitologicamente positivos para *Leishmania* spp., antes e após o tratamento com Miltefosina (Milteforan®). Adicionalmente, buscou-se entender a resposta terapêutica por meio da reavaliação cardíaca e aspecto clínico dos animais pós tratamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais Experimentais

Para este estudo foram selecionados 22 cães adultos (13 fêmeas e 9 machos), todos sem raça definida, de diferentes idades (adultos), provenientes do Canil Sagrado Coração de Jesus de Araçatuba, área endêmica para LVC. Todos os cães já haviam sido naturalmente infectados por *Leishmania* spp. A LVC foi determinada por diagnósticos clínicos (com base na pontuação da escala de escore clínico), sorológicos (sorologia ELISA e RIFI) e moleculares (parasitológico positivo em citologia de linfonodo ou medula óssea e qPCR positivo de linfonodo ou medula óssea).

2.2 Consentimento do Tutor

Alguns dos animais incluídos no estudo eram provenientes de tutores da região de Andradina/SP e Araçatuba/SP. Os tutores e/ou responsáveis legais dos animais foram informados e esclarecidos quanto aos procedimentos propostos pelo projeto de pesquisa. Durante a fase do experimento, os animais ficaram sob responsabilidade do investigador do estudo e equipe.

2.3 Critérios de Inclusão

Incluídos no estudo aqueles animais que atenderam aos seguintes critérios na seleção: Animais com pontuação na escala de escore clínico. Resultado positivo no exame parasitológico direto de citologia de medula e/ou linfonodo. Resultado positivo no teste molecular *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (da sigla em inglês qPCR) de medula e/ou linfonodo.

2.4 Critérios de Exclusão

Animais que apresentassem ao menos um dos seguintes critérios: animais com coinfeções, como por exemplo, *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp., avaliados por meio de teste sorológico rápido ELISA (Idexx®); animais com exames bioquímicos compatíveis com insuficiência renal; animais portadores de cardiopatias congênitas ou adquiridas. Após a inclusão no estudo, alguns dos animais foram removidos por afecções severas concomitantes ou quadros que poderiam interferir na avaliação da resposta ao tratamento proposto.

2.5 Locais do Procedimento Experimental

A fase experimental relacionada ao tratamento e manutenção dos animais foi realizada no Canil Sagrado Coração de Jesus de Araçatuba, localizado na cidade de Araçatuba/SP.

As análises laboratoriais hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Hospital Veterinário Mundo Animal, localizado na cidade de Andradina/SP.

A análises de qPCR e sorologia para *Leishmania* spp. foi realizada no Laboratório Centro de Diagnóstico Laboratorial Veterinário, localizado na cidade de Araçatuba/SP.

2.6 Aclimação

Os cães foram observados diariamente no canil experimental estruturado para garantir a biossegurança, ficando alojados cinco cães por baia (Figura 1), durante o período de outubro e novembro de 2021. O canil possui uma antecâmara, telada, para a passagem dos pesquisadores e funcionários de limpeza, de forma a impedir a entrada de insetos vetores dentro do local onde foram alocados. As áreas onde os animais ficaram mantidos foram colocadas telas de malha fina específica para inibir a passagem de flebotomíneos. Com a finalidade de assegurar a integridade das telas, chapas metálicas foram instaladas a altura suficiente para evitar danos às telas causados pelos animais. O ambiente também contou com controle de flebotomíneos por meio de armadilhas tipo CDC que ficou ligada diariamente entre as 17h de um dia até as 6h do dia subsequente.

Câmeras foram utilizadas para monitoramento dos animais, com o objetivo de identificar a ocorrência de brigas e acidentes com os cães alojados. Todas as baias continham bebedouros e comedouros, acesso à exposição ao tempo e enriquecimento ambiental (pneus, cordas, brinquedos, entre outros).

O piso do local era composto por grama, terra, cerâmico antiderrapante e rejuntado, apresentando um desnível para possibilitar a drenagem de líquidos. Cada baia possui ralo coberto com grelha metálica, além de tela, assim como canaletas que levam os dejetos para o esgoto, evitando assim a possível entrada de insetos. Os dejetos dos animais eram removidos mecanicamente duas vezes ao dia, e a limpeza dos canis realizada com água e hipoclorito de sódio a 2,5%.

Os animais eram alimentados com ração comercial específica para a espécie, duas vezes ao dia e tinham acesso *ad libitum* à água em bebedouros disponíveis no interior das baias. O consumo individual de água e alimento durante o período experimental não foi quantitativamente registrado.

Nos momentos experimentais pré-definidos para tratamento, exames e colheitas de amostras, os animais eram devidamente contidos por meio de técnicas de contenção próprias para a espécie em questão, sempre pela mesma pessoa responsável. Também realizadas leituras do microchip e documentação fotográfica.

Figura 1 – (A) Imagens do canil experimental, demonstrando a separação dos animais por baias.



Fonte: Arquivo Pessoal

2.7 Origem e Destino dos Animais

Os animais foram oriundos de ONGs, Centro de Controle de Zoonoses e tutores que aceitaram incluir seus animais no estudo, sendo estes localizados na região de Andradina/SP e região de Araçatuba/SP. Ao final do estudo retornaram aos tutores e/ou foram colocados para adoção após os investigadores julgarem os animais aptos para retorno.

2.8 Tratamentos Experimentais

2.8.1 Grupo Tratado

Dos 22 animais, 15 foram pertencentes ao grupo tratamento (GT), com um peso médio de 10 ± 2.24 kg e receberam, no momento D0, terapia à base de Miltefosina, de acordo com a recomendação de bula, com administração por via oral do Milteforan™ na dose de 2 mg/kg de peso, uma vez ao dia, durante 28 dias consecutivos. O produto Milteforan possui indicação para o tratamento de

LVC e está licenciado no MAPA sob o nº 000226-7.000003 de propriedade de Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda.

2.8.2 Grupo Controle Positivo

Dos 22 animais, 7 pertenciam ao grupo controle positivo (GC), com um peso médio de 11 ± 2.79 kg e receberam, no momento D0, o produto à base de solução fisiológica (NaCL 0,9%), administrado por via oral 1 mL para cada 10 kg de peso, uma vez ao dia, durante 28 dias consecutivos.

2.9 Tratamentos Concomitantes

Os únicos tratamentos concomitantes previstos foram os relacionados à sedação dos animais quando havia a necessidade, para coleta de amostras (linfonodos e medula óssea).

Durante o período experimental, incluindo o período de aclimatação, foi permitido o tratamento suporte desde que não interferisse nas avaliações. O investigador determinava a necessidade de uso de tratamentos concomitantes e no caso de confirmada a necessidade, as informações referentes ao nome comercial e/ou princípio(s) ativo(s), dose, via de administração, data do início do tratamento, período de tratamento e justificativa foram registradas.

2.10 Avaliação Clínica

Na anamnese foram obtidas informações de todos os animais sobre as condições gerais, grau de tolerância ao exercício, avaliação da tosse (quando presente), ocorrência de síncope ou dispneia. No exame físico, foi verificada a coloração das mucosas aparentes, temperatura retal (°C), frequência cardíaca (bpm) e respiratória (mrm), bem como auscultação cardíaca para verificar a presença de sopros ou arritmias. Também foi observada a presença de pulso jugular, hepatomegalia, ascite (prova do balotamento) e edema de membros.

Os exames clínicos foram realizados na pré-seleção (D0), no dia 14 (D14) e dia 28 (D28) após o tratamento, avaliando os parâmetros como: nível de consciência em comportamento, escore de condição corporal, temperatura retal (°C), frequência cardíaca (bpm) e frequência respiratória (mrm), estado de hidratação e avaliação das mucosas aparentes.

Tabela 1. Sinais clínicos dermatológicos, sistêmicos e oftálmicos associados a LV classificados com escore de 0 a 2: Os parâmetros foram classificados com os escores 0 (ausente), 1 (leve) e 2 (severo).

AVALIAÇÃO	DESCRIÇÃO
Linfadenopatia	Em caso de alteração, registrar o(s) linfonodo(s) alterado(s) e severidade
Epistaxis	Em caso de alteração, registrar o local da manifestação e severidade
Atrofia Muscular	Em caso de alteração, registrar a musculatura afetada e severidade
Conjuntivite - olho direito/esquerdo	Classificar severidade
Blefarite - olho direito/esquerdo	Classificar severidade
Uveíte - olho direito/esquerdo	Classificar severidade
Ceratite - olho direito/esquerdo	Classificar severidade
Claudicação	Em caso de alteração, registrar o membro afetado e severidade
Hiperqueratose	Classificar a severidade da alteração e região acometida
Descamação da pele	Classificar a severidade da alteração e região acometida
Alopecia	Classificar a severidade da alteração e região acometida
Despigmentação	Classificar a severidade da alteração e região acometida
Hiperpigmentação	Classificar a severidade da alteração e região acometida

Tabela classificatória para avaliação dos sinais clínicos. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 2. Sinais clínicos associados a LV classificados com escore de 0 e 1.

AVALIAÇÃO	DESCRIÇÃO
Alteração articular	Classificar a presença ou ausência da alteração, registrar a articulação afetada
Anorexia	Classificar a presença ou ausência da alteração
Esplenomegalia	Classificar a presença ou ausência da alteração
Onicogrifose	Classificar a presença ou ausência da alteração, registrar o membro acometido

Tabela classificatória para avaliação dos sinais clínicos. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 3. Sinais clínicos associados a LV classificados com escore de 0 e 3: Os parâmetros foram classificados com os escores 0 (ausente); 1 (leve); 2 (moderado); 3 (severo).

AVALIAÇÃO	DESCRIÇÃO
Úlceras na Pele	Classificar a severidade da alteração, registrar a região acometida
Nódulos na Pele	Classificar a severidade da alteração, registrar a região acometida

Tabela classificatória para avaliação dos sinais clínicos. Fonte: elaborada pelo autor.

2.11 Parâmetros Laboratoriais

2.11.1 Hemograma e Bioquímica Sérica

As coletas para obtenção de amostragens sanguíneas para realização dos exames de hemograma e bioquímica sérica foram realizadas durante o experimento no momento da pré-seleção (D0) e no D28 dias de terapia. Foi realizada antissepsia do local com álcool 70% e coletada uma amostra de 5 mL de sangue da veia jugular e/ou cefálica. Para esta coleta foram utilizadas seringas estéreis de 5 mL e agulha de calibre 25 x 7mm. O volume coletado foi fracionado em alíquotas: (A) tubo estéril de 1 mL com gel ativador de coágulo, para a realização de exame sorológico (prova), explicado no próximo item; (B) tubo estéril de 1 mL com gel ativador de coágulo, para a realização de exame

bioquímico e sorológico (contraprova) e; (C) tubo estéril de 1 mL contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) a 10% (Vacutainer®), para realização de hemograma.

As variáveis avaliadas em cada exame foram:

- Hemograma: contagem de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$), hemoglobina (g/dl), hematócrito (%), leucócitos (contagem total - / μl) e pesquisa de hemoparasitos;
- Perfil Bioquímico: níveis séricos de ureia (mg/dl), creatinina (mg/dl), fosfatase alcalina (FA) (U/l), alanina aminotransferase (ALT) (U/l), proteínas totais (g/dl), globulinas (g/dl), e albumina (g/dl).

Todas as amostras foram acondicionadas com os devidos cuidados para evitar contaminação e hemólise e, transportadas em caixas térmicas contendo gelo reciclável. As amostras para hemograma e bioquímica foram destinadas ao Hospital Veterinário Mundo Animal. A fração de soro não utilizada na prova bioquímica foi congelada como contraprova. A amostra de sangue para a prova sorológica foi encaminhada ao Laboratório CDLV. O processamento (obtenção do soro) desta amostra foi realizado no próprio laboratório no mesmo dia.

2.11.2 Detecção Molecular

Na pré-seleção (D0) e D28 foi realizada coleta de aspirado de medula óssea e linfonodos para a realização do qPCR pelo sistema Taqman (HIGUCHI et al., 1993). Para a coleta de medula óssea foi realizada tricotomia e antissepsia com álcool 70% em região de manúbrio esternal e para coleta dos linfonodos foi utilizado o linfonodo poplíteo (padronizado para todos os animais) e com o auxílio de seringas estéreis de 10 ml, agulha de calibre 40 x 12mm e 25 x 7 mm, e citoaspirador de Valleri®.

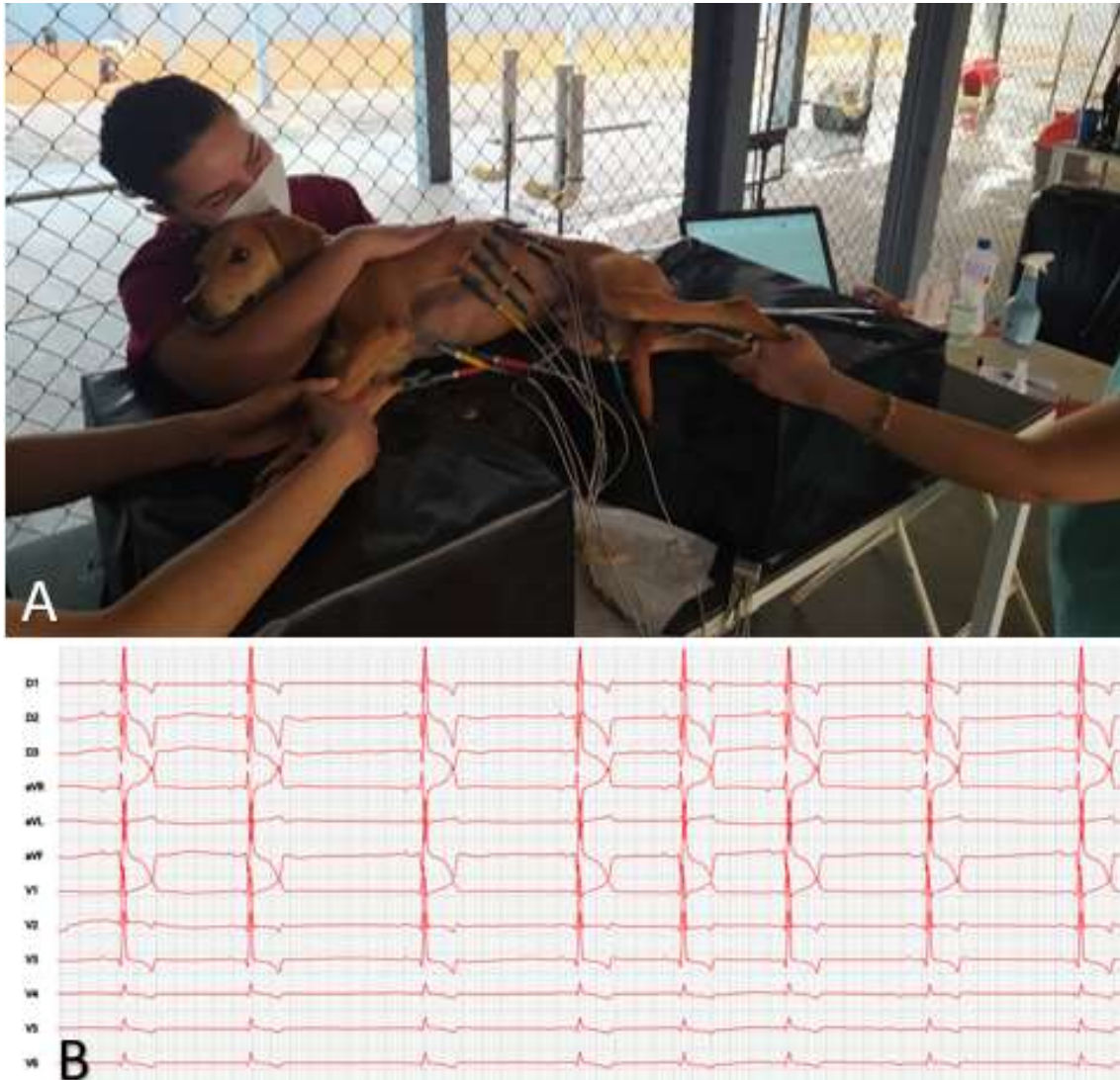
A amostra foi encaminhada ao laboratório imediatamente após a coleta. Todas as amostras foram transportadas em caixas térmicas contendo gelo reciclável.

2.12 Eletrocardiograma

O exame eletrocardiográfico foi realizado no plano frontal com os animais posicionados em decúbito lateral direito, membros paralelos entre si e

perpendiculares ao tronco (Figura 2), sem utilização de fármacos sedativos ou anestésicos. O aparelho eletrocardiógrafo utilizado no estudo foi o computadorizado digital (Inpulse® ECG InCardioDuo 2.9.0). Eletrodos do tipo jacaré foram fixados sobre a pele umedecida com álcool, para registro das derivações de membros bipolares I, II e III, monopulares, aVR, aVL e aVF e de derivações precordiais V1, V2, V3, V4, V5, V6. Posteriormente, os eletrocardiogramas gerados foram analisados e a mensuração das ondas, segmentos e intervalos realizada na derivação II, com a sensibilidade 10mm/mV (N) e velocidade 50 mm/s em software apropriado da Inpulse. As variáveis eletrocardiográficas estudadas foram: Ritmo; Frequência cardíaca; Unidades de duração e amplitudes analisadas: Onda P (ms); Complexo QRS (ms), Onda Q (mV), Onda R (mV), Ondas S (mV); Intervalo PR (ms) e avaliação do nivelamento do segmento ST (infradesnível ou supradesnível). Suas mensurações e valores de referências foram seguidas de acordo com as recomendações de Santilli (2020) e Tilley (1992 e 2004).

Figura 2: (A) Posicionamento dos animais para exame eletrocardiográfico. (B) Traçado eletrocardiográfico demonstrando derivações de membros bipolares, monopulares e pré-cordiais.



Fonte: Arquivo Pessoal

2.13 Ecocardiograma

O exame ecocardiográfico foi realizado com aparelho ecodopplercardiográfico (Sonoescape E2V®) com transdutores setoriais multifrequenciais de 1 a 6 MHz (para cães com peso maior que 10 kg) e de 2 a 9 MHz (para cães com peso menor que 10 kg), com registro eletrocardiográfico simultâneo. Os posicionamentos e mensurações das variáveis ecodopplercardiográficas foram realizados segundo as recomendações de Boon (2011). Para a realização do exame os cães foram posicionados em decúbito

lateral direito sob um colchão indicado para a realização da ecocardiografia, com a obtenção da janela paraesternal direita onde é possível realizar as imagens do eixo longitudinal e eixo curto. Em seguida os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para a obtenção da janela paraesternal esquerda onde foi possível obter as imagens do eixo apical e eixo cranial.

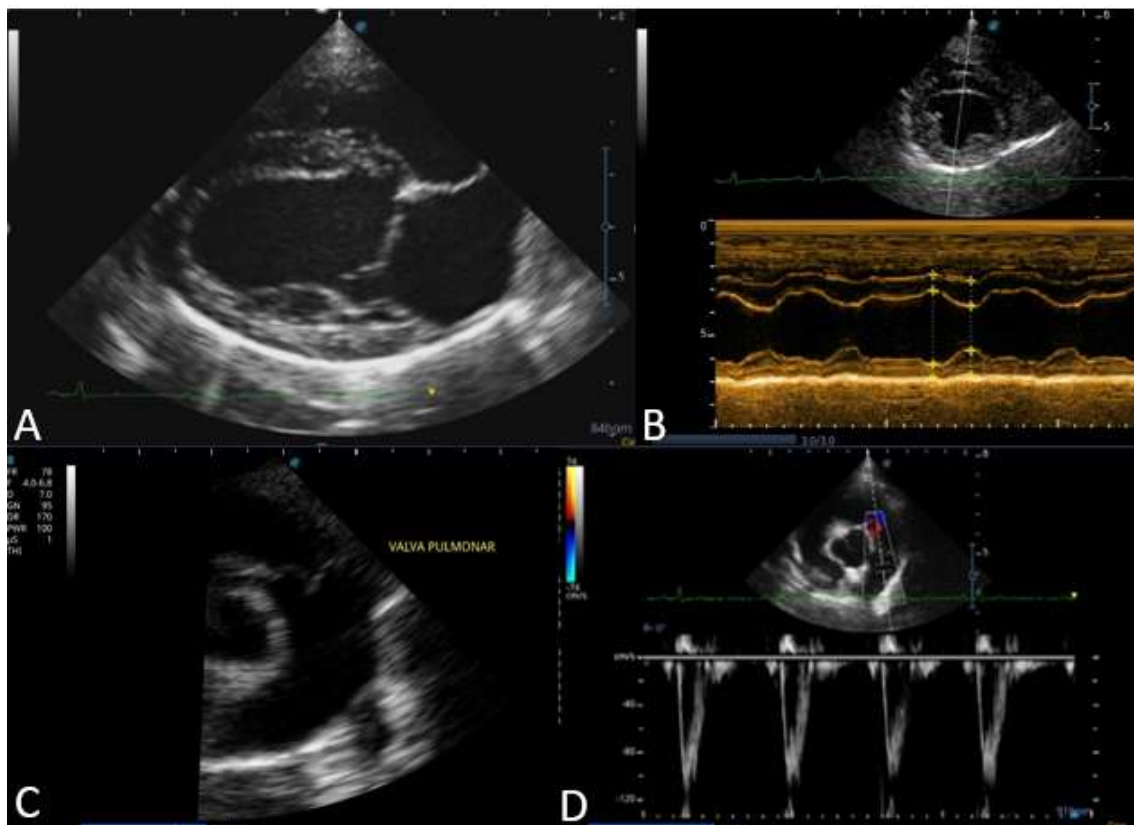
Na janela paraesternal direita utilizando o eixo curto, em plano papilar e cordal, aplicando o Modo-M foram mensuradas as variáveis: septo interventricular em diástole (SIVd); diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (DIVEd); parede livre do ventrículo esquerdo em diástole (PLVEd); septo interventricular em sístole (SIVs); diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole (DIVEs); parede livre do ventrículo esquerdo em sístole (PLVEs); cálculo da fração de ejeção (FEJ%) pelo método de Simpson modificado uniplanar e fração de encurtamento (FEC%) pelo método de Teichholz. Em sequência à imagem anterior, o transdutor foi inclinado dorsalmente até a visualização da imagem correspondente ao diâmetro atrial esquerdo e da artéria aorta, para mensurações separadas de seus diâmetros, bem como a relação entre estas câmaras (Relação AO/AE), após, foi visibilizada a artéria pulmonar e com o posicionamento do cursor Doppler pulsado distalmente aos folhetos da valva semilunar pulmonar e mensurado o pico de velocidade do fluxo transpulmônico (PVPUL).

Na sequência, o animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo para obtenção da imagem apical quatro câmaras pela janela paraesternal esquerda. A partir da imagem bidimensional, o cursor do Doppler pulsado foi posicionado na extremidade dos folhetos da valva mitral, para obtenção dos seguintes parâmetros: pico de velocidade de enchimento ventricular esquerdo rápido (Onda E) do fluxo mitral, pico de velocidade enchimento ventricular esquerdo lento (Onda A) do fluxo mitral e a relação entre essas duas ondas (Relação E/A). A partir da imagem apical cinco câmaras, obtida pela mesma janela, o cursor do Doppler pulsado foi posicionado distalmente aos folhetos da valva aórtica, mensurando-se o pico de velocidade do fluxo transaórtico (PVAO). Para a mensuração do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), o cursor do Doppler pulsado foi posicionado equidistante entre a via de saída do ventrículo esquerdo e o fluxo transmitral, sendo determinado o tempo desde o término do fluxo transaórtico até o início do enchimento ventricular esquerdo rápido (onda

E) do fluxo transmitral. O Doppler tecidual do ventrículo esquerdo (VE) foi realizado na imagem apical quatro câmaras com o cursor do Doppler espectral posicionado às margens septal e lateral do anel mitral, para a mensuração das medidas e velocidade tecidual na fase de enchimento rápido (E') e a velocidade de enchimento na fase de contração atrial (A'). A partir disso foi calculada a relação E'/A' .

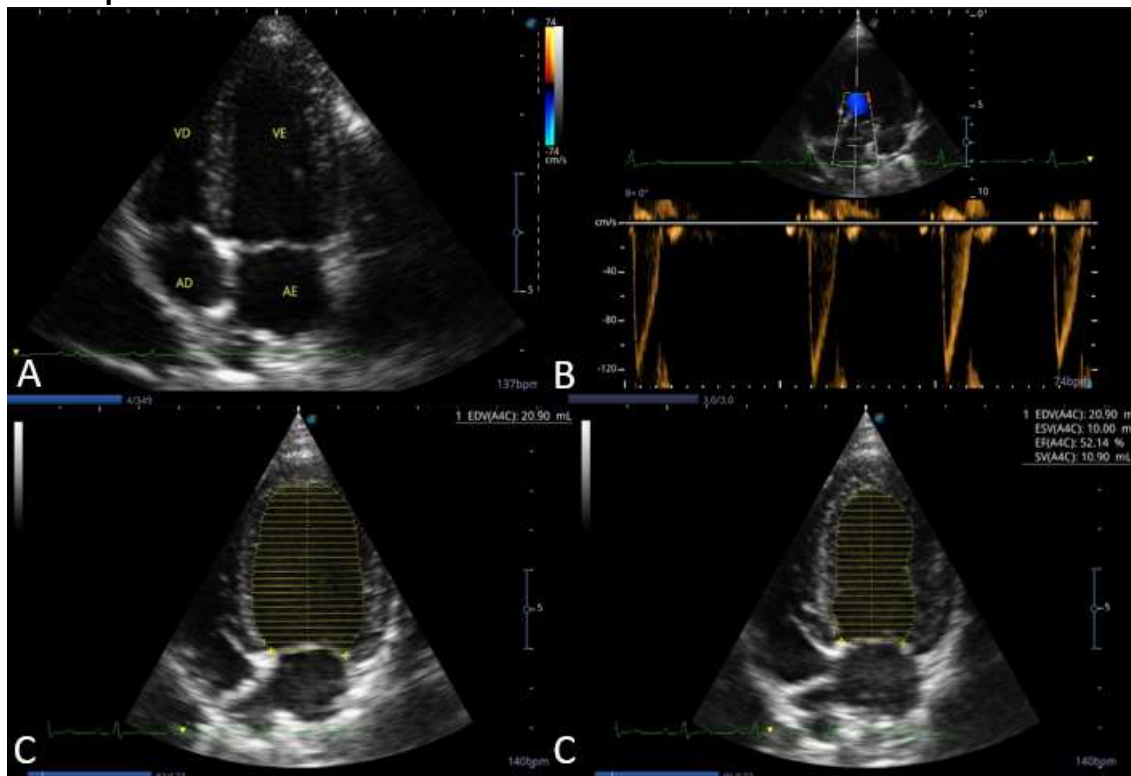
O movimento anular sistólico mitral (MAPSE) foi obtido através da imagem apical quatro câmaras com o cursor do modo M posicionado às margens septal e lateral do anel mitral. O mesmo procedimento foi realizado com o cursor do modo M posicionado às margens do anel tricúspide lateral para a mensuração da excursão sistólica do plano anular tricúspide (TAPSE).

Figura 3: Imagens ecocardiográficas bidimensionais (2B) obtidas na janela paraesternal direita, eixo longitudinal (A) e eixo transversal (B, C e D). (A) Modo bidimensional eixo longitudinal evidenciando as 4 câmaras. (B) Modo bidimensional do ventrículo esquerdo em plano cordal. (C) Modo bidimensional ao nível da bifurcação da artéria pulmonar. (D) Fluxo da via de saída do ventrículo direito, artéria pulmonar evidenciado por meio do doppler pulsado.



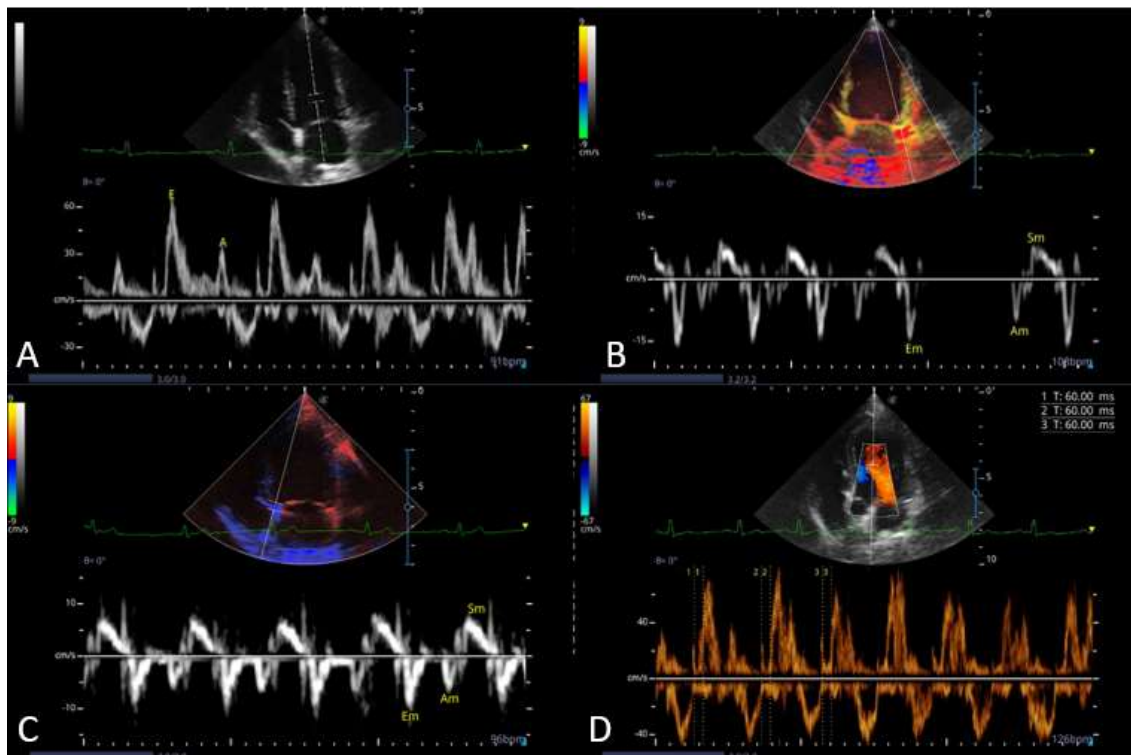
Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 4: Imagens ecocardiográficas bidimensionais (2B) apicais obtidas na janela paraesternal esquerda. (A) Imagem apical 4 câmaras. (B) Fluxo na via de saída do ventrículo esquerdo, espectro aórtico obtido pelo doppler pulsado. (C) Imagem apical 4 câmaras evidenciando a mensuração da Fração de Ejeção pelo método de Simpson modificado.



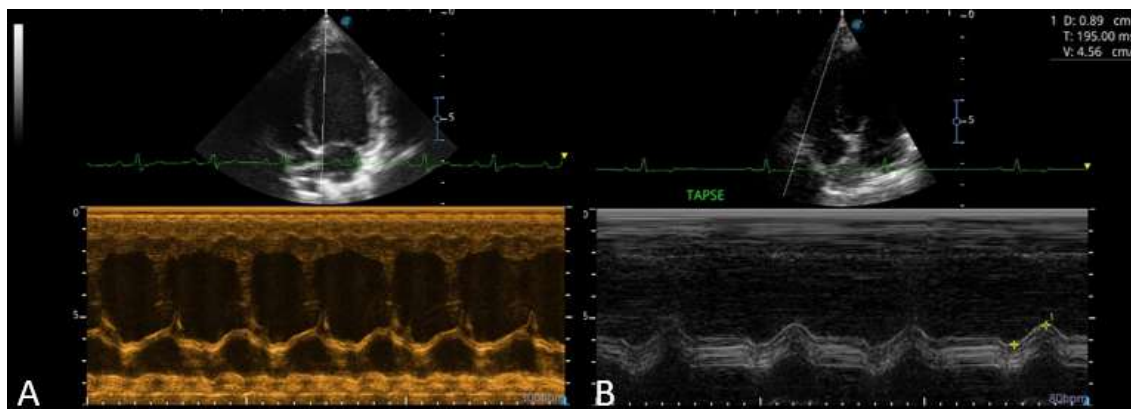
Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 5: Imagens ecocardiográficas bidimensionais (2B) apicais obtidas na janela paraesternal esquerda. (A) Imagem apical 4 câmaras evidenciando o fluxo na via de entrada do ventrículo esquerdo (onda E e onda A) obtido por meio do doppler pulsado. Imagem apical 4 câmaras demonstrando as velocidades de movimentação miocárdica diastólicas (onda E' e A') e sistólica (Onda S') do anel mitral parietal (B) e do anel mitral septal (C) obtidas por meio do doppler tecidual. (D) Imagem apical 5 câmaras demonstrando o tempo de relaxamento isovolumétrico.



Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 6: Imagens ecocardiográficas bidimensionais (2B) apicais obtidas na janela paraesternal esquerda. (A) Modo M posicionado no anel mitral septal para obtenção da excursão sistólica do anel mitral septal na imagem apical 4 câmaras. (B) Modo M posicionado no anel tricúspide parietal para obtenção da excursão sistólica do anel tricúspide na imagem apical 4 câmaras.



Fonte: Arquivo Pessoal

2.14 Análise Estatística

Na avaliação estatística das variáveis foi empregado a análise de variância para amostras repetidas (ANOVA) com comparação entre momentos e grupos por meio do *post-hoc* de Tukey ($p < 0.05$). Todas as variáveis foram submetidas à estatística descritiva a fim de investigar aderência dos dados às pressuposições da ANOVA. Caso estas não fossem atendidas, o teste não paramétrico de Friedman foi utilizado. Os dados foram analisados por meio do programa R.v. 3. 6.

3 RESULTADOS

Os achados clínicos mais encontrados nos cães do estudo foram: dermatopatias, onicogribose, linfadenomegalia e atrofia muscular, de acordo com o escore clínico dos animais em questão.

A média e o desvio padrão das variáveis laboratoriais do estudo estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, e na tabela 6 a descrição dos sinais que compõem a escala escore clínico para avaliação clínica, de acordo com o tratamento utilizado (GT ou GC) e o momento (M1 e M2) das avaliações.

Tabela 4. Variáveis laboratoriais hematológicas e de bioquímica sérica (média \pm desvio padrão) de cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Variável	Grupo	Momento	
		M1	M2
HE	GT	5.697 \pm 1.485	6.162 \pm 1.556
	GC	5.441 \pm 1.705	5.493 \pm 0.99
HT	GT	34.847 \pm 9.603	38.447 \pm 10.919
	GC	37.7 \pm 4.839	33.629 \pm 6.953
HG	GT	12.547 \pm 3.526	13.227 \pm 3.738
	GC	12.814 \pm 1.889	11.729 \pm 2.462
LEUC	GT	10.933 \pm 5.54	7.935 \pm 4.391
	GC	15.033 \pm 5.505	8.907 \pm 3.402
PT	GT	9.273 \pm 1.635	8.907 \pm 1.781
	GC	10.686 \pm 1.076	10.014 \pm 1.675
ALB	GT	2.9 \pm 0.965	2.573 \pm 0.42
	GC	2.957 \pm 0.237	2.543 \pm 0.207
GLOB	GT	6.187 \pm 1.272	6.16 \pm 1.508
	GC	7.443 \pm 1.049	7.486 \pm 1.772
CREAT	GT	0.96 \pm 0.292	1.18 \pm 0.665
	GC	0.9 \pm 0.183	0.914 \pm 0.186
UREIA	GT	19.2 \pm 11.315	0 \pm 0
	GC	13 \pm 3.098	0 \pm 0
FA	GT	38.4 \pm 31.722	26.533 \pm 17.435
	GC	14 \pm 5.508	28.429 \pm 20.395
ALT	GT	70.6 \pm 70.32	48.267 \pm 33.727
	GC	45.857 \pm 19.794	41.571 \pm 12.04

HE: hemácia; HT: hematócrito; HG: hemoglobina; LEUC: leucócitos totais; PT: proteína plasmática total; ALB: albumina; GLOB: globulina; CREAT: creatinina; UREIA: ureia; FA: fosfatase alcalina; ALT: alanina amino transferase. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 5. Variáveis laboratoriais de qPCR (medula óssea e linfonodo) e o escore clínico (média \pm desvio padrão) de cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Variável	Grupo	Momento	
		M1	M2
qPCR MO	GT	509109.32 \pm 1588855.49	1115729.129 \pm 4132749.984
	GC	177860.434 \pm 0.044	88494.733 \pm 0.18
qPCR Linf	GT	74449.844 \pm 172292.693	211361.789 \pm 551483.489
	GC	97867.419 \pm 112177.219	498340.737 \pm 747602.913
ESCORE	GT	13.067 \pm 4.574	6.6 \pm 3.521
	GC	15.286 \pm 4.499	8.857 \pm 3.288

qPCR MO: PCR em tempo real quantitativo de medula óssea (cópias por micolitro); qPCR Linf: PCR em tempo real quantitativo de linfonodo (cópias por micolitro); ESCORE: escore clínico dos sinais clínicos associados a LVC. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 6. Variáveis de escore clínico (média) de cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

(continua)

Variável	Grupo	Momento	
		M1	M2
Linfadenomegalia	GT	2	1
	GC	2	1
Epistaxis	GT	0	0
	GC	0	0
Atrofia muscular	GT	2	1
	GC	2	1
Conjuntivite - OD	GT	0	0
	GC	0	0
Conjuntivite – OE	GT	0	0
	GC	0	0
Blefarite – OD	GT	0	0
	GC	0	0
Blefarite – OE	GT	0	0
	GC	0	0
Uveíte - OD	GT	0	0
	GC	0	0
Uveíte – OE	GT	0	0
	GC	0	0
Ceratite – OD	GT	0	0
	GC	0	0
Ceratite – OE	GT	0	0
	GC	0	0
Claudicação	GT	0	0
	GC	0	0
Hiperqueratose	GT	0	0
	GC	0	0
Descamação pele	GT	1.5	0.5
	GC	2	1
Alopecia	GT	2	1
	GC	2	1
Hiperpigmentação	GT	0	0
	GC	0	0
Despigmentação	GT	0	0
	GC	1	0
Alteração articular	GT	0	0
	GC	0	0
Anorexia	GT	0	0
	GC	0	0
Esplenomegalia	GT	1	1
	GC	1	1
Onicogribose	GT	1	1
	GC	1	1

Tabela 6. Variáveis de escore clínico (média) de cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

(conclusão)

Variável	Grupo	Momento	
		M1	M2
Úlceras de pele	GT	1	0
	GC	2	0
Nódulos de pele	GT	0	0
	GC	0	0

OD: Olho direito; OE: Olho esquerdo. Fonte: elaborada pelo autor.

Com relação aos níveis séricos PT, 60% dos cães (n=9) do GT apresentaram hiperproteinemia antes do tratamento (M1) e 100% dos cães (n=7) do GC apresentaram hiperproteinemia antes do tratamento (M1). Após o tratamento (M2) 53% dos cães (n=8) se mantiveram com a PT elevada no GT, e 6% (n=7) deles tiveram redução dos valores à normalidade. Já no GC 71,4% dos cães (n=5) se mantiveram com a PT elevada, sendo que 28,5% destes animais (n=2) tiveram redução dos valores à normalidade. Apesar dos resultados, não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

No exame molecular de qPCR, 100% dos cães (n=22) foram positivos em M1 tanto para o GT quanto para o GC. E em M2, quatro animais (26,7%) negativaram no qPCR de medula óssea após o tratamento no GT e quatro animais (26,7%) negativaram no qPCR de linfonodo após o tratamento no GT. Quanto ao GC apenas um animal (14,3%) se apresentou negativo no qPCR de medula óssea após o tratamento com o placebo. Não houve diferença estatística para análise este parâmetro, entre os momentos e os grupos ($p > 0,05$).

Quanto ao escore clínico dos animais estudados, houve diferença estatística ($P = 0.0004620$) entre o M1 do GT com o M2 do GT, com melhora dos sinais clínicos em ambos os grupos, porém, no GT a melhora foi mais significativa, demonstrada pela diferença estatística entre o M1 do GC com o M2 do GT ($P = 0.0001758$).

A média e o desvio padrão (DP) das variáveis eletrocardiográficas e ecocardiográficas do estudo estão apresentados nas Tabelas 7, 8, 9 e 10 de acordo com o tratamento utilizado (GT ou GC) e o momento (M1 e M2) das mensurações.

Tabela 7. Variáveis eletrocardiográficas (média \pm desvio padrão) de cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Variável	Grupo	Momento	
		M1 (média \pm DP)	M2 (média \pm DP)
FC	GT	108.4 \pm 22.665	106.533 \pm 18.435
	GC	119 \pm 18.815	113 \pm 26.026
Duração P	GT	42.133 \pm 3.889	42 \pm 2.507
	GC	43.714 \pm 2.928	40.571 \pm 2.507
Intervalo PR	GT	92.8 \pm 18.108	95.733 \pm 7.086
	GC	88 \pm 7.483	88.571 \pm 8.223
Duração QRS	GT	58.667 \pm 7.355	58.133 \pm 4.984
	GC	57.143 \pm 2.545	57.429 \pm 5.855
Duração T	GT	50.267 \pm 16.069	47.467 \pm 9.724
	GC	45.714 \pm 11.101	54.857 \pm 11.88
Amplitude P	GT	0.187 \pm 0.066	0.201 \pm 0.049
	GC	0.194 \pm 0.068	0.17 \pm 0.044
Amplitude Q	GT	0.25 \pm 0.186	0.294 \pm 0.155
	GC	0.394 \pm 0.322	0.307 \pm 0.228
Amplitude R	GT	4.881 \pm 4.426	1.397 \pm 0.473
	GC	1.674 \pm 0.312	1.334 \pm 0.476
Amplitude S	GT	0.134 \pm 0.119	0.196 \pm 0.147
	GC	0.036 \pm 0.105	0.09 \pm 0.088
Amplitude T	GT	0.019 \pm 0.339	0.051 \pm 0.243
	GC	0.133 \pm 0.164	0.173 \pm 0.183
ST	GT	0.036 \pm 0.062	0.011 \pm 0.083
	GC	0.013 \pm 0.068	0.02 \pm 0.08

FC: frequência cardíaca; Duração P: duração de Onda P; Intervalo PR: duração do intervalo PR; Duração QRS: duração de complexo QRS; Duração T: duração de Onda T; Amplitude P: amplitude de Onda P; Amplitude Q: amplitude de Onda Q; Amplitude R: amplitude de Onda R; Amplitude S: amplitude de Onda S; Amplitude T: amplitude de Onda T; Segmento ST: ST: nivelamento de segmento ST. Fonte: elaborada pelo autor.

Em relação às alterações eletrocardiográficas dos pacientes no M1 do GT dos 15 pacientes, 7 (47%) apresentaram alterações sugestivas de distúrbio de repolarização ventricular como infradesnivelamento de segmento ST (n=3) e Onda T maior que 25% de Onda R (n=4). Após o tratamento proposto (M2), 2 (13%) pacientes permaneceram com distúrbio de repolarização caracterizados por Onda T maior que 25% de Onda R. Contudo, a redução não foi significativa entre o grupo tratado nos diferentes momentos ($p>0,05$).

Quanto às alterações eletrocardiográficas dos pacientes em M1 do GC, os principais achados foram: 3 (43%), dos 7 pacientes, apresentaram alteração sugestiva de sobrecarga atrial esquerda, como o aumento de duração de Onda P (n=3). Após o tratamento proposto (M2), um paciente apresentou distúrbio de repolarização ventricular, apresentando Onda T maior que 25% de Onda R e um dos pacientes apresentou Bloqueio atrioventricular de 2º grau Mobitz Tipo 1. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) sobre estas variáveis.

O estudo das variáveis ecocardiográficas obtidas e comparadas entre os momentos e grupos estudados, estão descritos nas tabelas 4 a 6, respectivamente.

Tabela 8. Média e desvio padrão das variáveis ecocardiográficas de função sistólica em cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Variável	Grupo	Momento	
		M1	M2
SIVd (mm)	GT	6.326±1.086	6.981±1.385
	GC	7.285±1.421	6.777±1.091
DIVEd (mm)	GT	28.827±3.272	30.153±3.502
	GC	31.743±3.119	32.657±3.214
PLVEd (mm)	GT	10.041±3.572	7.646±2.338
	GC	7.412±1.788	7.485±0.684
SIVs (mm)	GT	8.627±2.372	8.160±2.051
	GC	10.257±1.238	9.985±0.919
DIVEs (mm)	GT	18.667±2.551	19.107±3.731
	GC	20.786±3.119	21.457±2.266
PLVEs (mm)	GT	9.321±2.462	12.081±3.263
	GC	11.514±1.812	11.585±2.118
FEC (%)	GT	33±2.646	35.867±3.292
	GC	34.143±5.669	33.857±3.132
FEJ (%)	GT	46.933±6.777	61.4±4.793
	GC	48.571±5.593	62.143±7.798
MAM L (mm)	GT	1.66±0.32	1.923±0.424
	GC	1.644±0.439	1.65±0.446
MAM S (mm)	GT	1.53±0.249	1.864±0.356
	GC	1.639±0.39	1.489±0.326
Onda S (mm)	GT	0.933±0.219	0.88±0.19
	GC	0.86±0.196	0.914±0.135

SIVd: septo interventricular em diástole; DIVEd: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole; PLVEd: parede livre do ventrículo esquerdo em diástole; SIVs: septo interventricular em sístole; DIVEs: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole; PLVEs: parede livre do ventrículo esquerdo em sístole; FEC: fração de encurtamento; FEJ: fração de ejeção pelo método de Simpson; MAM L: movimento anular sistólico mitral lateral; MAM S: movimento anular sistólico mitral septal; Onda S: onda S sistólica do movimento miocárdico. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 9. Média e desvio padrão das variáveis ecocardiográficas de função diastólica em cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Variável	Grupo	Momento	
		M1	M2
Onda E (ms)	GT	0.618±0.113	0.622±0.132
	GC	0.64±0.072	0.621±0.11
Onda A (ms)	GT	0.377±0.119	0.487±0.265
	GC	0.427±0.16	0.371±0.108
Relação E/A	GT	1.724±0.385	1.552±0.308
	GC	1.619±0.425	1.739±0.362
Onda E' (ms)	GT	0.099±0.024	0.09±0.023
	GC	0.084±0.019	0.099±0.011
Onda A' (ms)	GT	0.094±0.026	0.085±0.026
	GC	0.099±0.032	0.093±0.013
Relação E'/A'	GT	1.125±0.451	1.108±0.36
	GC	0.97±0.34	1.077±0.231
TRIV	GT	58.867±9.884	60.8±9.382
	GC	57.857±4.811	64.714±8.635

Onda E: velocidade de enchimento precoce do VE; Onda A: velocidade de enchimento lento; Onda E': velocidade de relaxamento miocárdico precoce; Onda A': velocidade de relaxamento miocárdico na contração atrial; E/A: relação entre onda E e onda A; E'/A': relação entre onda E' e onda A'; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 10. Variáveis hemodinâmicas dos fluxos pulmonar e aórtico, valores do diâmetro atrial esquerdo e aórtico e de função sistólica ventricular (média \pm desvio padrão) de cães submetidos ao tratamento com Miltefosina (GT, n=15) e os que receberam placebo (GC, n=7) de acordo com os momentos avaliados no estudo (M1 = D0) e (M2 = D28).

Variável	Grupo	Momento	
		M1	M2
VM Aorta (ms)	GT	1.068 \pm 0.133	1.069 \pm 0.187
	GC	1.044 \pm 0.044	0.993 \pm 0.18
VM Pulmonar (ms)	GT	0.682 \pm 0.139	0.722 \pm 0.133
	GC	0.736 \pm 0.142	0.993 \pm 0.18
AO	GT	15.295 \pm 4.292	17.893 \pm 2.446
	GC	18.442 \pm 1.450	19.457 \pm 2.383
AE	GT	22.913 \pm 2.639	24.681 \pm 3.381
	GC	25.314 \pm 1.806	26.785 \pm 3.503
Relação AO/AE	GT	1.404 \pm 0.124	1.382 \pm 0.112
	GC	1.372 \pm 0.061	1.375 \pm 0.083
TAPSE	GT	11.06 \pm 1.423	11.904 \pm 1.855
	GC	12.486 \pm 2.45	12.657 \pm 2.212

MV Aorta: velocidade máxima de fluxo em artéria aorta; MV Pulmonar: velocidade máxima de fluxo em artéria pulmonar; AO: aorta; AE: átrio esquerdo; Relação AO/AE: relação aorta/átrio esquerdo. TAPSE: excursão sistólica do plano anular tricúspide. Fonte: elaborada pelo autor.

Dentre as alterações ecocardiográficas relacionadas a função sistólica dos pacientes em M1 do GT, foram encontrados: dos 15 animais, 13 (87%) apresentaram redução da FEJ antes da terapia com aumento significativo após a terapia instituída quando comparados os dois momentos estudados (p-valor: 0.0000007) e os grupos (p-valor: 0.0002767), com significativa melhora, houve melhora dos valores de FEJ do CG após o tratamento, mas se correlacionarmos com a FEC que reduziu após o tratamento, este resultado não fica significativo.

As alterações ecocardiográficas relacionadas a função sistólica longitudinal através do método MAPSE dos pacientes em M1 do grupo GT, foram: Dos 15 animais, 6 (40%) apresentaram redução dos valores de MAPSE e 2 (13,3%) dos pacientes apresentaram aumento dos valores. Após o tratamento proposto (M2) 4 (26,7%) apresentaram aumento dos valores. Houve

diferença estatística frente ao tratamento, quando comparados os momentos ($p=0.025268$).

Já sobre a função sistólica longitudinal através do MAPSE dos pacientes em M1 do grupo GC, os achados foram: Dos 7 pacientes, 3 (42,8%) apresentaram redução da variável e 1 (14,3%) o aumento dos valores. Após o tratamento proposto (M2), 3 dos pacientes permaneceram com a mesma alteração de redução dos valores. Não houve diferença estatística entre os momentos ($p>0,05$) no GC.

Sobre as alterações ecocardiográficas relacionadas a função diastólica dos pacientes em M1 do grupo GT, foram encontrados: Dos 15 animais, 3 (20%) apresentaram alteração de relaxamento ventricular e após o tratamento os pacientes permaneceram com as mesmas alterações e no GC dos 7 pacientes, 4 (57%) apresentaram alteração de relaxamento ventricular e após o tratamento os pacientes permaneceram com as mesmas alterações. Portanto, não houve diferença estatística entre os grupos e os momentos ($p>0,05$) sobre as variáveis ecocardiográficas de função diastólica.

4 DISCUSSÃO

A avaliação eletrocardiográfica e ecocardiográfica de cães com LVC seguiu um protocolo de estudo que permitiu o estabelecimento de uma análise morfológica comparativa de pacientes crônicos para a doença, antes e após o tratamento, correlacionando com dados clínicos e laboratoriais. O exame ecocardiográfico mostrou-se de fácil realização, sendo que todas as mensurações padrões foram passíveis de realização. Porém, a realização da ferramenta *strain* por *speckle tracking* para avaliação de deformação miocárdica traria mais benefícios para correlacionar e detectar lesões miocárdicas mais precoces, de acordo com Silva et al. (2021), em que encontraram disfunção diastólica em segmentos basais do ventrículo esquerdo e nestes mesmos segmentos, deformação miocárdica por *speckle tracking*.

Este foi um estudo pioneiro para a avaliação de disfunções sistólicas e diastólicas em comparação com as fases de tratamento e acompanhamento dos animais, sabendo que a detecção de miocardite já é constatada por outros autores em estudos similares (LÓPEZ-PEÑA et al., 2009; ALVES et al., 2010; TORRENT et al., 2005; SASAKI et al., 2020). No presente trabalho foi constatada

disfunção sistólica envolvendo um comprometimento cardíaco do ventrículo esquerdo, contudo, o tratamento com a miltefosina foi capaz de promover a melhora da função sistólica, dado relevante deste estudo.

Poucos são os estudos que descrevem as alterações cardiológicas em exames como o eletrocardiograma e o ecocardiograma encontradas em cães naturalmente infectados pelo parasito, devido a isso, a intenção na realização deste estudo, foi mostrar os achados em exames complementares cardiológicos, associados aos aspectos clínicos e laboratoriais. Várias alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas encontradas sugerem que a doença pode acometer, também, o coração de forma precoce de cães com LVC, as quais podem resultar em complicações inflamatórias antes mesmo da ocorrência de sintomas clínicos perceptíveis aos tutores. López-Peña et al. (2009) e Alves et al. (2010), descreveram tais alterações após avaliação histológica do miocárdio de cães naturalmente infectados por LVC e evidenciaram miocardite linfoplasmocitária, principalmente na região subendocárdica e subepicárdica, além de necrose de coagulação de cardiomiócitos, aumento de colágeno intersticial e presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.* no coração.

Foram selecionados para este estudo somente animais saudáveis, sem quaisquer cardiopatias de base, visto que, no sistema cardiovascular, os danos provocados pela LVC em cães e seres humanos ainda não são bem compreendidos, devido a carência de pesquisas científicas que aprofundem a relação do parasito com o órgão. Silva (2007), detectou formas de *Leishmania (l.) chagasi* no tecido cardíaco em baixas concentrações, porém, não foi possível afirmar que as alterações encontradas se deram por ação direta da *Leishmania sp.* ou pela resposta à infecção sistêmica.

Todos os animais foram monitorados a fim de se excluir causas sistêmicas que pudessem interferir nos resultados dos exames laboratoriais e cardiológicos. Pois, além da lesão direta causada pelo parasito, o miocárdio pode sofrer consequências associadas a condições sistêmicas também causadas pela LVC. Sabe-se que a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é prevalente em cães com doença renal secundária à LVC, não apenas nos estágios mais severos, mas também nas fases iniciais da doença, antes mesmo destes se tornarem azotêmicos (PUERTO-ALONSO et al., 2006). Dentre estas consequências, as

manifestações e alterações cardíacas têm grande importância em cães com HAS. O aumento da pós carga leva a uma hipertrofia miocárdica compensatória, dependendo do grau de hipertrofia podem surgir as disfunções sistólicas e diastólicas. Dos animais estudados, nenhum apresentou alterações renais, porém, não foi possível a realização da aferição de pressão arterial, devido as condições do lugar, onde todos os animais ficavam no mesmo lugar, gerando fonte de estresse e resultados duvidosos. Ademais, não foram encontradas alterações ecocardiográficas sugestivas de lesão em órgão alvo de uma possível hipertensão como a hipertrofia ventricular.

Graças à inserção da ecocardiografia na rotina clínica de pequenos animais, os pacientes podem ser avaliados quanto ao início da disfunção diastólica, com o objetivo de somar estratégias terapêuticas que aumentem o tempo de sobrevivência, sendo então possível avaliar se há associação e as repercussões destas lesões na função cardíaca, ou seja, se as injúrias miocárdicas e variações da pressão arterial sistêmica causadas pela LVC, tem associação com parâmetros ecocardiográficos de disfunção diastólica (LARSSON, 2010). Dentre a avaliação convencional através do Doppler espectral somada ao método Doppler tecidual, foi possível a identificação de todas as fases de disfunção diastólica, inclusive a de pseudonormalização, alteração esta que foi a mais encontrada nos animais estudados (53% no GT e 57% no GC).

A miocardite reflete o envolvimento focal ou difuso do músculo cardíaco em um processo inflamatório, cujas consequências dependem da localização, extensão e duração do envolvimento cardíaco (TORRENT et al., 2005). Com as técnicas convencionais ecocardiográficas utilizadas, foi possível realizar uma análise global da função sistólica ventricular esquerda, não sendo possível a detecção de disfunções focais ou mais precoces. O diagnóstico de miocardite é muitas vezes desafiador devido à heterogeneidade de cenários clínicos, que podem variar de apresentação semelhante à síndrome coronariana aguda, insuficiência cardíaca, condições com risco de vida, como choque cardiogênico e arritmias (SOARES et al., 2015; DANTAS-TORRES et al., 2006 e FERRARI et al., 2006).

Alterações eletrocardiográficas e níveis elevados de troponina cardíaca não são específicos nem sensíveis para miocardite (SASAKI et al., 2020), haja

vista que não houve diferença estatística nas variáveis eletrocardiográficas do nosso estudo, mesmo com as alterações encontradas.

Na ecocardiografia, a miocardite pode ser caracterizada por disfunção ventricular global inespecífica, anormalidades regionais da movimentação da parede (TSCHÖPE et al., 2021). Dentre os achados relacionados a disfunção sistólica encontrados no estudo, há a suspeita de miocardite nos pacientes, pois foi observado 87% de redução nos valores de FEJ pelo método de Simpson no M1 do GT e após o tratamento apenas 13% dos animais permaneceram com a alteração, demonstrando uma melhora significativa da função sistólica ventricular esquerda dos pacientes após a terapia com Miltefosina. Adicionalmente, melhora nos animais do GC também foi observada, porém, quando analisado este dado em conjunto com os valores de FEC, em que houve redução dessa variável após o tratamento, este dado não se torna significativo. Contudo, quando associada a função sistólica longitudinal avaliada através do MAPSE, 40% dos animais do GT apresentaram redução dos valores, demonstrando disfunção sistólica de fibras longitudinais e após o tratamento houve melhora do parâmetro demonstrada pela diferença estatística frente ao tratamento, quando comparados os momentos ($p=0.025268$), ressaltando a importância da associação das técnicas ecocardiográficas.

Dos pacientes presentes no estudo, 26,7%, apresentaram aumento do valor de MAPSE no M2 tanto no GT quanto no GC, o que pode ser explicado devido a agitação e medo dos pacientes no momento do exame, responsável pela elevação dos valores devido a ativação do sistema nervoso autônomo simpático (SCHOBEDR et al, 2001).

Uma análise definitiva da miocardite só é possível na biópsia endomiocárdica, que é o padrão ouro diagnóstico (LAKHDIR et al., 2020), nos animais do nosso estudo não foi possível a realização da avaliação histopatológica, pois muitos dos animais eram pertencentes de tutores.

A avaliação do *strain global* do miocárdio através da ecocardiografia *speckle tracking* foi fidedigno para o diagnóstico de miocardite fulminante em humanos com fibrose e edema pulmonar nos casos em que não é possível realizar a ressonância magnética (SPERLONGANO et al, 2022). Visto isso, se faz necessário mais estudos com essas técnicas avançadas a fim do diagnóstico precoce das alterações miocárdicas pela LVC. Degiovanni et al. (2021), também

demonstraram que o *strain* é uma ferramenta útil para diagnósticos de deformidades regionais no caso de miocardites focais para diagnósticos precoces.

Nas avaliações ecocardiográficas gerais há um perfil de disfunção diastólica em segmentos basais do ventrículo esquerdo para os pacientes infectados com parasitos da LVC (SILVA et al, 2021). Achados estes que corroboram com as alterações encontradas em nosso estudo. E os mesmos segmentos reafirmados pelo estudo de deformação miocárdica através de *speckle tracking*, porém esta técnica não foi possível de ser realizada em nosso estudo. Silva et al. (2021), também correlacionaram que a avaliação segmentar do ventrículo esquerdo em função da presença de miocardite evidenciou achados de infiltrados inflamatórios em baixa prevalência, se concentrando na região apical septal, na análise histopatológica.

Segundo Rosa et al. (2014), os resultados de seu estudo confirmam o desenvolvimento de alterações histopatológicas e a presença do parasita no miocárdio de cães naturalmente acometidos por LVC. Entretanto, novos estudos são necessários para melhor elucidar a patogenia das alterações histopatológicas observadas, bem como sua evolução diante do curso natural da enfermidade ou de seu tratamento (ROSA et al, 2014). Isso ressalta a importância da avaliação cardíaca de animais positivos para LVC antes e após o tratamento adequado, visto que encontramos melhora nos parâmetros de função sistólica após a terapia com Miltefosina.

Dentre as alterações eletrocardiográficas do presente estudo, a mais encontrada foi o distúrbio de repolarização ventricular, dados estes que corroboram com os relatos de Torrent et al. (2005), que avaliaram o comprometimento miocárdico em cães com LVC, onde encontraram alterações como bloqueio átrio ventricular de primeiro grau e infradesnivelamento do segmento ST, achados estes, evidenciados no exame eletrocardiográfico, além da presença de pequenas áreas hemorrágicas e pálidas verificadas por avaliação macroscópica do epicárdio, também alterações histopatológicas compatíveis com miocardite severa. Contudo, ressalta-se a importância da análise histopatológica para confirmação das áreas afetadas pela lesão do parasito.

Em nosso estudo, um animal apresentou a presença de complexo atrial prematuro com eixo de onda P dentro dos valores de normalidade, assim como descrito por Solano-Gallego et al., (2009) onde foi relatada a ocorrência de *sinus arrest*, bloqueio de ramo direito, complexos atriais prematuros e maior duração da onda P e complexo QRS em cães com LVC.

Em um dos cães do estudo foi possível observar a presença de bloqueio atrioventricular de 2º grau. Em cães, o bloqueio átrio ventricular está associado a doenças cardíacas, especialmente miocárdicas, incluindo cardiopatias congênitas, cardiomiopatia infiltrativa, fibrose idiopática, infarto do miocárdio, endocardite bacteriana e miocardite (SANTOS et al., 2013). O mesmo estudo avaliou histologicamente sistema de condução cardíaco em 12 cães, onde foi possível observar a presença de miocardite linfocítica com bloqueio atrioventricular completo. A análise histológica mostrou miocardite ativa caracterizada por intensa infiltração de células mononucleares, principalmente linfóides, associada à degeneração e necrose dos cardiomiócitos adjacentes.

Da mesma forma, Silva et al. (2009) foi relatada a ocorrência de pericardite crônica associada à *Leishmania chagasi* em um cão, com infiltrado multifocal de moderado a acentuado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, e discreta inflamação no miocárdio. De forma similar, um relato isolado de cão com LV revelou a presença de miocardite e poliarterite necrosante no átrio direito deste animal (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). No entanto, em nenhum destes relatos foram evidenciados os efeitos clínicos da doença (ALVES et al., 2010), assim como os apresentados no nosso estudo, onde nenhum dos animais estudados apresentaram alterações clínicas sistêmicas cardiológicas. Em contrapartida, relatos em seres humanos descrevem taquicardia e sopro sistólico, além da presença de derrame pericárdico discreto em portadores da afecção (DESJEUX et al., 2004).

A reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR), é uma ferramenta consistente e confiável para o diagnóstico e monitoramento da redução parasitária após terapia (BENASSI, 2015; NOGUEIRA et al., 2019). Com isso, a qPCR foi escolhida para o acompanhamento da progressão da doença e resposta à terapia em nossos pacientes, onde foi encontrado redução da carga parasitária após os 28 dias de tratamento e alguns animais até

negativaram após este período, corroborando com os resultados do trabalho de NOGUEIRA et al., (2019) onde foi demonstrado a detecção de DNA da *L. infantum* por qPCR e uma diminuição drástica foi observada em seis e 12 semanas após o início da terapia. Esses resultados sugerem que a Miltefosina pode reduzir a carga parasitária dos cães tratados. Os mesmos animais que mantinham títulos altos da carga parasitária, foram os mesmos, principalmente no GT, que não apresentaram melhora das variáveis de função sistólica, com isto, podemos inferir sobre a correlação da melhora dos parâmetros ecocardiográficos com a melhora de dados clínicos e laboratoriais.

5 CONCLUSÃO

Nós concluímos que, a leishmaniose visceral canina pode promover diversas alterações na funcionalidade cardiovascular, principalmente em parâmetros de função sistólica e diastólica ventricular. Também constatamos que a miltefosina se mostrou eficaz no tratamento da doença clínica e nos parâmetros ecocardiográficos de função sistólica ventricular esquerda, porém promoveu poucas mudanças nos achados eletrocardiográficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.88, n.2, p. 371-378, 2004.

ALVES, G.B.B.; PINHO, F.A.; SILVA, S.M.M.S.; CRUZ, M.S.P.; COSTA, F.A.L. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmanis (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, n.3, p.310-315, 2010.

BANETH, G.; KOUTRINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; Canine Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Elsevier Saunders, p.735-748. 2012.

BENASSI J. C. Detecção de *Leishmania spp.* por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e eqüinos. [Dissertação]. [São Paulo – SP] Pirasssununga: **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo**. 2015.

BOON, J. A. **Manual of Veterinary Ecocardiography**. 2ªEd. Baltimore: Wiley-Blackwell, 2011.

BRIFFOD, C. Revue actuelle en matiere de leishmaniose canine. **These d'exercice, Médecine vétérinaire**, Toulouse 3, 2011.

BRITO, F. et al. Histopathological findings and detection of parasites in the eyes of dogs infected naturally with *Leishmania chagasi*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, 2010.

DANTAS-TORRES F, BRANDÃO-FILHO SP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo;48(3):151-56. 2006.

DEGIOVANNI, A. PASTORE, M. C. SPINONI, E. G. FOCARDI, M. CAMELI, M. PATTI, G. Usefulness of a multiparametric evaluation including global longitudinal strain for an early diagnosis of acute myocarditis. *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, 37:3203–3211, 2021.

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

DIAMANTINO, T. C. C. Leishmaniose visceral: Avaliação das repercussões cardiovasculares secundárias à doença e ao tratamento em crianças e adolescentes tratadas com três esquemas terapêuticos. **[Tese]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais**; 2010.

DOMINGUES P. M. J. Uma perspectiva geral sobre Miocardites. **[Tese]. Universidade da Beira Interior**. 2011.

FERRARI, H. F.; RIBEIRO, D.; LUVIZOTTO, M. C. R. Miocardite associada à *Leishmania* sp em cão - relato de caso. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal. Proceedings...Jaboticabal: **Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, p. 48. 2006.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, GAVIN.; WATSON, R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. **Nature Publishing Group**. 1993.

KÜHL U. & SCHULTHEISS H.P. Viral myocarditis. Review article: **Medical intelligence**.144:1. 2014.

LARSSON, M.H.M.A. **Tratado de Cardiologia de Cães e Gatos**. 1ªEd. Interbook, São Caetano do Sul-SP, 2020.

LÓPEZ-PEÑA, M.; ALEMAÑ, A.; MUÑOZ, F.; FONDEVILA, D.; SUÁREZ, M. L.; GOICOA, A.; NIETO, J. M. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.51, 2009.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações Patológicas em animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, I, 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, p.15-22. 2006.

MAGNO, S. S. Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) submetidos a um protocolo terapêutico em uma Clínica Veterinária de Belo Horizonte. [Dissertação]. [Belo Horizonte – MG] Belo Horizonte: **Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais**; 2007.

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

MANNA, L.; GRAVINO, A.E.; PICILLO, E.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Leishmania DNA Quantification by Real-time PCR in Naturally Infected Dogs Treated with Miltefosine. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1149: p. 358-360. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral** – Brasília – Brasil, 2006.

MOFREDJ, A.; GUERIN, J.M.; LEIBINGER, F.; MASMOUDI, R. Visceral

leishmaniasis with pericarditis in an HIV-infected patient. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v.34, p. 151-153, 2002.

MORAIS, C.F.; DUARTE, M.I.S.; CORBETT, C.E.P.; REIS, M.M. Alterações morfológicas cardíacas no curso da leishmaniose visceral humana. Estudo baseado em 16 casos de necropsia. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v.51, n. 6, p.441-445, 1988.

NOGUEIRA, F. S. Avaliação clínico-laboratorial de cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral, submetidos à terapia com anfotericina B. [Tese]. **Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista**; 2007.

NOGUEIRA, F. S. et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, 12:79, 2019.

PACHECO, A. D. Miocardiopatia em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral: aspectos histopatológicos e da resposta imune. [Tese]. **Araçatuba: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista**; 2016.

PUERTO-ALONSO, J.L.; MOLINA-RUANO, F.J.; GÓMEZ-SOTO, F.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, F. Leishmaniasis visceral con afectación cardíaca en un paciente inmunocompetente. **Medicina Clínica**, v.127, n.13, p.519, 2006.

ROSA, F. A. J. LEITE, H. A. C.; BRAGA, E. T.; MOREIRA, P. R. R.; F. H.; BIONDON, BALTAZAR, A. W.; PADUA, P. P. M.; VASCONSELOS, R. O.; CAMACHO, A. A.; FERREIRA, W. L.; MACHADO, G. F.; and MARCONDES, M. Cardiac Lesions in 30 Dogs Naturally Infected With *Leishmania infantum* chagasi. **Veterinary Pathology**, 2014.

REGUERA, M. ROSA. MORAN, M. PÉREZ-PERTEJO, Y. GARCÍA-ESTRADA, C. BALAÑA-FOUCE, R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v 227, 2016.

SANTOS, F. P. et al. Aspectos clínicos e histopatológicos do miocárdio de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral. [Tese]. **Uruguiana: Fundação Universidade Federal do Pampa**, 2013.

SILVA, A. B. S. Standard Echocardiography, Two-dimensional Longitudinal Strain by Speckle Tracking of the Left Ventricle in Dogs Naturally Affected With Visceral Leishmaniasis. [Tese]. **Universidade Federal do Piauí**, 2021.

SILVA, B. C.; RACHID, M. A.; VIEIRA, F. G.; FIGUEIREDO, M. M.; VALLE, G. R.; TAFURI, W. L.; TOLEDO JÚNIOR, J. C.; RIBEIRO, V. M. Chronic pericarditis in a naturally *Leishmania (Leishmania) chagasic* infected dog. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.2, n.2, p.107-109, 2009.

SILVA F. L.; OLIVERA R. G.; SILVA T. M. A.; XAVIER M. N.; SILVA F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. 871 1(1): 20-31. 2007.

SASAKI, T. SAEKI, V. HIRAKAWA, A. MACHIDA, N. Pathological Features of Complete Atrioventricular Block in Dogs with Lymphocytic Myocarditis. **J. Comp. Path.** Vol. 174, 18e25, 2020.

SCHOBEDR, K. e FUENTES, V. L. Mitral annulus motion as determined by m-mode echocardiography in normal dogs and dogs with cardiac disease. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Vol. 42, No. 1, pp 52-61, 2001.

SOARES, P. S. et al. Alterações cardíacas em cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, 37(4):339-344, out/dez 2015.

SOLANO-GALLEGO, L. KOUTINAS, A. MORÓ, G. CARDOSO, L. PENNISI, M. G. FERRER, L. BOURDEAU, P. OLIVA, G. BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v 165, 2009.

SPERLONGANO, S. et al. Acute myocarditis: prognostic role of speckle tracking echocardiography and comparison with cardiac magnetic resonance features. **Heart and Vessels**. 37:121–131, 2022.

SOUSA, M.G. et al. Assesment of the electrocardiogram in dogs with visceral leishmaniasis. **Pesquisa Vetirinária Brasileira**. v.33, n.5, p.643-647, 2013.

TILLEY LP, BURTNICK NL. ECG: eletrocardiografia para o clínico de pequenos animais. São Paulo: **Roca**; 2004.

TILLEY LP. Essentials of canine and feline electrocardiography: interpretation and treatment. **Philadelphia: Lea & Febiger**; 1992.

TORRENT, E.; LEIVA, M.; SEGALÉS, J.; FRANCH, J.; PEÑA, T.; CABRERA, B.; PASTOR, J. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.46, n.11, p.549-552, 2005.

TSCHÖPE, C. et al. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: current evidence and future directions. **Nature Reviews Cardiology**. V, 18, March, 169, 2021.

ZABALA, E. E.; RAMÍREZ, O. J.; BERMÚDEZ, V. Leishmaniasis visceral en um canino. **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias**, v.46, n.2, p.43-49, 2005.