

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA – FMVA**

**ACHADOS OFTÁLMICOS DE CÃES NATURALMENTE
ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL,
SUBMETIDOS À TERAPIA COM MILTEFOSINA**

Carolina Bruno Barbosa Ricci
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA – FMVA**

**ACHADOS OFTÁLMICOS DE CÃES NATURALMENTE
ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL,
SUBMETIDOS À TERAPIA COM MILTEFOSINA**

Carolina Bruno Barbosa Ricci

Orientador: Prof. Adjunto Alexandre Lima de Andrade

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Araçatuba – SP
2018

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

R491a Ricci, Carolina Bruno Barbosa

Achados oftálmicos de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos à terapia com miltefosina / Carolina Bruno Barbosa Ricci.

Araçatuba: [s.n], 2018.

70 f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2018

Orientador: Prof. Adjunto Alexandre Lima de Andrade

1. Leishmaniose visceral. 2. eletroretinografia. I. T.

CDD 616.9364



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

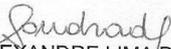
Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ACHADOS OFTÁLMICOS DE CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS POR
LEISHMANIOSE VISCERAL, SUBMETIDOS À TERAPIA COM MILTEFOSINA

AUTORA: CAROLINA BRUNO BARBOSA RICCI
ORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE
COORIENTADOR: FÁBIO DOS SANTOS NOGUEIRA

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


Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. FLÁVIA DE REZENDE EUGÊNIO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. ALEXANDRE PINTO RIBEIRO
Departamento de Clínica Médica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso

Araçatuba, 20 de agosto de 2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Acheados oftálmicos de cães naturalmente acometidos por Leishmaniose Visceral, submetidos à terapia com miltefosina

AUTORA: CAROLINA BRUNO BARBOSA RICCI

ORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

COORDENADOR: FÁBIO DOS SANTOS NOGUEIRA

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

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. FLÁVIA DE REZENDE EUGÊNIO

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. ALEXANDRE PINTO RIBEIRO

Departamento de Clínica Médica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso

Araçatuba, 20 de agosto de 2018.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Carolina Bruno Barbosa Ricci - nascida em 22 de dezembro de 1984 na cidade de Santos - SP. Médica Veterinária formada pela Universidade de Marília, Unimar, no ano de 2006. Ingressou em 2007 no programa de residência na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Marília, Unimar, Marília - SP, tendo-o concluído em 2008. Realizou a Especialização em Oftalmologia e Microcirurgia Ocular pelo Instituto Qualittas de Pós-graduação, São Paulo – SP, no período de 2013 a 2015. Iniciou o curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, campus de Araçatuba – SP, em fevereiro de 2016, sob orientação do Professor Adjunto Alexandre Lima de Andrade.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Carlos e Valéria, pelo amor, dedicação, e incentivo aos estudos, e ao meu amado marido, Caio, por se manter incansavelmente ao meu lado, me permitindo sempre seguir em frente, independente dos obstáculos que apareçam em meu caminho.

AGRADECIMENTOS

A minha família pela confiança e amor incondicional, estando sempre presentes ao meu lado, me dando apoio, sendo minha base. Sem vocês não seria nada.

Ao meu orientador, professor Alexandre, que mesmo não me conhecendo da graduação, me deu a oportunidade de mostrar que seria capaz, me orientando com toda a dedicação e me ensinando mais dessa área que me encanta diariamente, que é a Oftalmologia Veterinária.

Ao meu co-orientador e um grande amigo Prof. Dr. Fábio dos Santos Nogueira, que seguiu ao meu lado nesse trabalho, me ensinando e me ajudando a tornar esse estudo tão importante para nossos queridos pacientes.

Ao meu marido que compreende as minhas escolhas, me apoiando sempre, mesmo que elas façam com que por diversos momentos me torne ausente. Não mediu em nenhum momento esforços para me ajudar e me permitir concluir mais essa etapa.

Ao meu pequeno príncipe Bernardo, que junto de mim sempre esteve, uma parte dentro de mim e a outra ao meu lado durante esse processo. Mamãe teve que se ausentar por alguns momentos, mas meus pensamentos eram sempre em você, querendo te dar meu melhor.

À todos os professores que fizeram parte da minha trajetória acadêmica. Cada um de vocês fez a diferença na minha construção.

Ao querido professor Antônio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk, com quem iniciei os aprendizados em Oftalmologia Veterinária, e aprendo até hoje. Nunca mediu esforços em me ajudar, e acreditou que eu teria potencial para mais essa etapa. Você será sempre minha referência.

À equipe de pesquisa: as médicas veterinárias Ana Paula, Ana Letícia, Fernanda Liguori, ao médico veterinário Breno e a estagiária Mariana. Sem vocês o projeto não se concretizaria.

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.

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

À Universidade de Marília, Unimar, onde tudo começou. Onde me ensinaram a grande importância de se manter estudando, valorizando sempre o aluno e o estudo científico.

À grande amiga Ana Paula que me apoiou e me incetivou muito até o último minuto dessa etapa. Ainda as queridas amigas Mayara e Laís, pela ajuda e solidariedade ao me cederem um lar em Araçatuba nesses dois anos, me fazendo sentir em casa. A amiga que conquistei no final, mas não menos importante, Aline, pelo apoio e ajuda principalmente nesse momento.

À todos os meus pacientes e seus tutores, que acreditaram nesse estudo e confiaram seus filhos em nossas mãos. Sem vocês, nada teria acontecido.

MEU MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

1	CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
	1.1 Leishmaniose visceral canina no Brasil e no mundo.....	11
	1.2 Manifestações clínicas da LV canina.....	13
	1.3 Oftalmopatias decorrentes da LV canina.....	15
	1.4 Segmento posterior e fundo de olho em cães.....	21
	1.5 Sistema visual e eletrorretinografia.....	25
	1.6 Diagnóstico	28
	1.7 Tratamento.....	30
	REFERÊNCIAS.....	34
2	CAPITULO 2 – ACHADOS FUNDOSCÓPICOS E DE ELETORRETINOGRRAFIA DE CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL, SUBMETIDOS À TERAPIA COM MILTEFOSINA	43
	2.1 Introdução.....	44
	2.2 Material e Métodos.....	46
	2.2.1 Animais.....	46
	2.2.2 Diagnóstico e exames complementares.....	46
	2.2.3 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real.....	47
	2.2.4 Exame oftálmico e eletrorretinografia.....	47
	2.2.5 Tratamento.....	49
	2.2.6 Análise estatística.....	49
	2.3 Resultados.....	50
	2.4 Discussão.....	63
	2.5 Conclusões.....	69
	REFERÊNCIAS.....	69

ACHADOS OFTÁLMICOS DE CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL, SUBMETIDOS À TERAPIA COM MILTEFOSINA

RESUMO - A leishmaniose visceral (LV) canina caracteriza-se por uma enorme variabilidade de manifestações clínicas, dentre elas, lesões dermatológicas e oculares. Poucos são os estudos com as alterações do segmento posterior de olhos de cães acometidos pela doença, devido, principalmente, à opacidade do segmento anterior. O objetivo do trabalho foi avaliar e descrever as principais alterações fundoscópicas e eletrorretinográficas observadas em cães naturalmente acometidos por LV, antes e após o tratamento com a miltefosina. Foram selecionados oito cães, que não apresentavam outras doenças infecciosas ou vasculares, e apresentassem meios oculares transparentes. Utilizaram-se registros fotográficos do segmento posterior e a avaliação da funcionalidade da retina através da eletrorretinografia (ERG). Os achados de fundoscopia incluíram atenuação vascular, hiperrefletividade, pigmentação retiniana, embainhamento vascular, hiperpigmentação peripapilar, hemorragia sub-retiniana, turbidez vítrea, papiledema e tortuosidade vascular. Todos os animais se beneficiaram clinicamente da terapêutica medicamentosa, não sendo mais encontradas hemorragia sub-retiniana e turbidez vítrea após tratamento, e somente um animal permanecia com a lesão de embainhamento vascular. A avaliação dos registros de ERG mostrou diminuição da amplitude de onda "b" nas respostas de bastonetes e máxima resposta entre os momentos. Conclui-se que a LV promove alterações no fundo de olhos de cães antes mesmo da ocorrência de perda visual e a miltefosina é eficaz no tratamento da doença, porém promovendo poucas mudanças dos achados de fundoscopia e de ERG.

Palavras-chave: antiprotozoário, eletrorretinografia, fundo de olho, leishmaniose visceral

FINDINGS DOGS OPHTHALMIC NATURALLY AFFECTED BY VISCERAL LEISHMANIASIS, UNDERGOING THERAPY WITH MILTEFOSINE

ABSTRACT - Visceral leishmaniasis (VL) canine is characterized by a huge variability of clinical manifestations, among them skin and eye damage. Few studies of the changes of the posterior segment of an eye of dogs affected by the disease, mainly due to the opacity of the anterior segment. The objective was to assess and describe the main fundus and ERG changes observed in dogs naturally affected by LV before and after treatment with miltefosine. Eight dogs were selected which showed no vascular or other infectious diseases, and to produce clear ocular media. They used photographic records of the posterior segment and evaluation of retinal function by electroretinography. The findings included fundus vascular attenuation, increased reflective, retinal pigmentation, vascular sheathing, peripapillary hyperpigmentation, subretinal hemorrhage, atrophy of the optic disk, vitreous turbidity, papilledema, vascular tortuosity. All animals were clinically benefit of drug treatment, no longer found bleeding subretinal and vitreous turbidity after treatment, only one animal was to vascular sheathing. The evaluation of the ERG records showed decreased amplitude wave "b" in the responses of rods and maximum response between times. It concludes that the LV promotes changes in the dog's eyes background even before the occurrence of visual loss and miltefosine is effective in treating the disease, but provided few changes of fundus findings and ERG.

Key words: antiprotozoal, electroretinography, eye fundus, visceral leishmaniasis

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Leishmaniose visceral canina no Brasil e no mundo

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 (DANTAS-TORRES et al., 2006).

No mundo, o Calazar, como também é conhecida, 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 90% dos casos ocorrendo na Índia, Bangladesh, Sudão e Brasil (MANNA et al., 2009). Na América Latina, a doença foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90 % dos casos ocorrem no Brasil, especialmente no Nordeste (BRASIL, 2006).

Os dados epidemiológicos de 2002 revelaram a peri-urbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentes as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2006).

Mudanças epidemiológicas, devido principalmente à sua urbanização, alterações climáticas e a própria adaptação da doença, vem aumentando significativamente o número de casos caninos e humanos, tornando um grave problema de saúde pública em todas as regiões do Brasil (BRASIL, 2006). Ainda, atribui-se uma maior incidência a mudanças populacionais e viagens internacionais, sendo maior encontrada em crianças, como também em pessoas imunossuprimidas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e

transplantadas. Casos esporádicos são descritos em adultos não infectados (MANNA et al., 2009).

A LV é uma enfermidade infecciosa não contagiosa, severa, de caráter crônico, causada por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, e que apresentam diversidades clínicas significantes (DANTAS-TORRES et al., 2006; DESJEUX, 2004; MANNA, et al., 2009).

A *Leishmania donovani* é responsável pela LV no Subcontinente Indiano e África Oriental, enquanto a *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* são predominantes na Bacia do Mediterrâneo e nas Américas, respectivamente (MANNA et al., 2009). Os seres humanos são o único reservatório conhecido de *L. donovani*. Canídeos e cães domésticos são reservatórios hospedeiros para *L. infantum* e *chagasi* (DANTAS-TORRES et al., 2006; DESJEUX, 2004). Os cães são considerados os principais reservatórios deste parasito no ciclo epidemiológico da doença (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

A forma mais aceita de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de artrópodes, dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo), e conhecidos popularmente por flebotomíneos (ALENCAR et al., 1991; DANTAS-TORRES et al., 2006; NOGUEIRA, 2007).

No Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor responsável pela disseminação e transmissão da doença (BRASIL, 2006). O vetor ao picar um animal infectado, ingere juntamente com o sangue células do sistema mononuclear fagocitário contendo amastigotas, e assim permanecem no intestino do flebotomíneo, sofrendo divisões constantes e mudando progressivamente para formas promastigotas, paramastigotas metacíclicas infectantes e durante um novo repasto sanguíneo, infectam outro hospedeiro vertebrado (BRIFFOD, 2011).

Na sua superfície, as formas paramastigotas metacíclicas infectantes

expressam grande quantidade de LPG e de gp63, que em conjunto são responsáveis pela proteção do parasita da ação de enzimas líticas no hospedeiro invertebrado, quanto da ação das células de defesa do hospedeiro vertebrado (OLIVER et al., 2005).

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). Alguns pesquisadores relatam que a saliva dos flebotomíneos exerce importante papel na transmissão da *Leishmania*, potencializando a infecção, quer seja pela sua capacidade anticoagulante, quer por conter peptídeos (Maxadilan) de grande poder vasodilatador (BRIFFOD, 2011).

O cão representa um papel importante no ciclo epidemiológico da doença, pois pode apresentar intenso parasitismo cutâneo e assim servir de fonte de infecção para o vetor, aumentando a transmissão. Além disso, vivem dentro de casas ou nas suas proximidades, favorecendo o ciclo (MANNA et al., 2009).

A leishmaniose visceral (LV) canina caracteriza pela sua enorme variabilidade de manifestações clínicas, devido basicamente a fatores individuais relacionados exclusivamente ao tipo de resposta imunológica desenvolvida, grau de infestação parasitária, tempo de evolução e aos órgãos afetados (FERRER, 1995). Em alguns casos, tanto humanos como caninos podem ter infecções assintomáticas por longos períodos (MANNA et al., 2009).

1.2 Manifestações clínicas da LV canina

A resposta imune do animal no momento da infecção e posterior a ela é um fator determinante no desenvolvimento dos mecanismos patogênicos e sinais clínicos. Assim, não são todos os animais que manifestam a doença

clínica (ALVAR et al., 2004; GREENE, 2006).

A susceptibilidade do hospedeiro à doença depende diretamente da resposta imunológica dos linfócitos T e a imunidade celular é mais importante que a humoral para a replicação do parasita, progressão ou cura da doença (GREENE, 2006). O animal infectado inicialmente não tem sintomas aparentes, porém, pode posteriormente apresentar uma forma progressiva da doença, ocorrer remissão até a cura, ou ainda, nunca desenvolver a enfermidade (PINELLI et al., 1999).

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 sub-populações 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, citotoxicidade e controle da infecção. As células Th2 mediam a imunidade humoral, através da produção predominantemente das interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13 e apresenta comportamento antagonista das células Th1, com produção de grande quantidade de imunocomplexos que irão se depositar na parede dos vasos em diversas regiões do organismo, constituindo o componente mais patogênico da enfermidade (BRIFFOD, 2011; DAY, 2004).

A leishmaniose é uma enfermidade de curso crônico, cujos sinais clínicos iniciam 3 meses a 7 anos após a infecção. Com a resposta imune, os linfócitos T esgotam-se nos órgãos linfoides e então, inicia-se a proliferação das células B, histiócitos, macrófagos e células plasmáticas resultando em aumento generalizado dos órgãos linfoides (linfadenomegalia e esplenomegalia) e hiperglobulinemia. Anemia e trombocitopenia são

frequentemente observadas e ocorre ainda, presença de imunocomplexos circulantes que ocasionam vasculite, poliartrites, uveítes e glomerulonefrites (GREENE, 2006).

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 em saliências ósseas e margem interna da pua; dermatite nodular; hiperqueratose nasal e digital; e dificuldade de cicatrização (BRIFFOD, 2011; FONDATI et al., 2004).

A onicogribose, resultado da estimulação da matriz ungueal pela presença do parasito, é uma das características mais marcantes e pode ser considerado um sinal patognomônico (GENARO, 1993; SLAPENDELL, 1988).

As lesões renais associadas à infecção por leishmaniose visceral nos cães são decorrentes do depósito de imunocomplexos nos glomérulos e por ativação do complemento, causando normalmente a morte do animal por glomerulonefrites (FERRER, 1992).

Além da perda de peso, encontra-se, frequentemente, uma mioatrofia preferencialmente em músculos esqueléticos mastigatórios e temporal (KOUTINAS et al., 2004; SLAPENDELL, 1988).

Sinais clínicos de diáteses hemorrágicas causadas principalmente por vasculites podem ser observados em animais com LV, bem como petéquias dispersas pelo corpo, hematúria, e principalmente epistaxes (FERRER, 1992).

1.3 Oftalmopatias decorrentes da LV canina

A leishmaniose visceral canina promove frequentemente manifestações oculares. Segundo alguns autores, aparecendo em 20% a 40% dos animais infectados (GREENE, 2006), em 16% dos animais (CIARAMELLA et al., 1997);

24,1% (KOUTINAS et al., 1999); 24,4% (PEÑA et al., 2000); 46% (TRONCARELLI et al., 2009); 42,10% (SLAPPENDEL, 1988); 76% (BRITO et al., 2006); 80,49% (NOVALÉS, 1991). A disparidade entre os dados deve-se à escassez de trabalhos publicados, aliado ao fato de que a incidência das lesões é maior quando analisadas por um especialista, do que quando analisada por um clínico geral, à patogenicidade da *Leishmania* envolvida, à resposta imune do animal e ao estágio da doença (BRITO et al., 2006).

As lesões clínicas envolvendo as estruturas oculares e anexos em cães com leishmaniose visceral são normalmente decorrentes da presença do parasito e consequente infiltração leucocitária, ou como resultado de um processo imunomediado com depósito de imunocomplexos (GARCIA-ALONSO et al., 1996).

Alguns pesquisadores sugerem que a doença ocular pode ser uni ou bilateral e até mesmo causar mais de uma alteração no mesmo olho (BRITO et al., 2010; PEÑA et al., 2000). Estudos têm demonstrado uma maior predominância das lesões no segmento anterior, e que as primeiras estruturas oculares que se alteram são a conjuntiva e a úvea, devido a sua maior vascularização (BRITO et al., 2010; MOLLEDA et al., 1993).

As alterações oculares mais comumente observadas são: blefarites; ceratoconjuntivite seca ou não, sendo essas as mais frequentes (CIARAMELLA et al., 1997; PEÑA et al., 2000; SLAPPENDEL, 1988); uveítes; conjuntivite folicular ou membranosa; granulomas palpebrais ou córneo-conjuntivais, e panofalmites (FULGÊNCIO, 2006; MAGNO, 2007; NOGUEIRA, 2007; PEÑA et al., 2000; ROZE, 2004). Outras manifestações oculares são referidas como a hiperemia conjuntival com quemose, hifema e afecções corneais como a ceratite superficial ou profunda (ROZE, 2004).

Em outros estudos realizados com avaliação oftalmológica de animais com leishmaniose visceral, cita-se como maior incidência a uveíte anterior linfoplasmocítica ou granulomatosa (GREENE, 2006; MOLLEDA et al., 1993;

PEÑA et al., 2000). Normalmente estas uveítes granulomatosas são resistentes à terapia tópica e/ou sistêmica e evoluem para quadros de glaucomas e endoftalmítes, com conseqüente perda do globo ocular (KOUTINAS et al., 1999; ROZE, 2004).

Outras oftalmopatias mais incomuns na leishmaniose são coriorretinites, descolamento de retina, catarata, glaucoma (PEÑA et al., 2008; Di PIETRO et al., 2016) e celulite orbital (Di PIETRO et al., 2016).

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

Em outro estudo no Sul da Itália, 150 cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral foram avaliados, e observaram 24 animais (16%) com oftalmopatias, sendo a ceratoconjuntivite, uveíte e a panoftalmite as mais encontradas. Os autores não consideraram a alopecia periocular (27 animais - 18%) como alteração oftalmológica, mas sim dermatológica (CIARAMELLA et al. 1997).

Koutinas et al.,(1999) encontraram uma prevalência de 24,1% em um estudo clínico envolvendo 158 cães na Grécia, sendo as conjuntivites (12%), blefarites (8,2%), uveítes (3,9%) as mais prevalentes.

No Brasil, Fulgêncio (2006) avaliaram 65 casos de oftalmopatias em cães com sorologia positiva para *Leishmania sp.* em Belo Horizonte – MG. As alterações mais prevalentes foram blefarite (25,4%), uveíte (23,8%), conjuntivite (20,0%), ceratoconjuntivite seca (15,4%), alopecia periocular (13,9%), descolamento de retina (9,2%), e ceratite (7,7%).

Um estudo realizado por PIETRO et al. (2016), que avaliou comparativamente a prevalência de lesões oculares em cães de um abrigo

municipal e de propriedade de clientes atendidos no hospital veterinário na Sicília (Itália), ambos naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, mostrou que a uveíte anterior foi o achado oftalmológico mais freqüente em cães de clientes (37,5%), enquanto nos animais de abrigo, as blefarites e alopecias perioculares foram as mais evidentes. O autor acredita que a reação imune uveal pós tratamento pode explicar a diferença na freqüência de uveíte entre cães de propriedade de clientes e cães de abrigo.

A patogênese da ceratoconjuntivite seca (CCS) em cães positivos para leishmaniose ainda não foi totalmente esclarecida e várias hipóteses têm sido citadas na literatura para explicar a deficiência na produção lacrimal. Dentre estas hipóteses, a ação destrutiva direta do parasita com posterior processo inflamatório nas glândulas lacrimais, e a diminuição dos reflexos secretórios são as teorias mais aceitas (ROZE, 1986).

Naranjo et al., (2005) estudaram as glândulas envolvidas e observaram a presença de infiltrado inflamatório linfistioplasmocitário nas glândulas da terceira pálpebra e de meibômio.

De acordo com Brito et al. (2010), que fez avaliação histopatológica de olhos de cães com leishmaniose visceral, no que diz respeito à membrana nictitante, foi encontrado um intenso infiltrado inflamatório na região subepitelial, ao redor dos folículos linfóides e ductos secretores, além de atrofia acinar, justificando o déficit na produção de lágrima desses animais.

As blefarites do tipo ulcerativa ou nodular são bastante frequentes e podem mimetizar outras enfermidades cutâneas parasitárias como a demodicose e escabiose (SCOTT et al., 2001). A análise histopatológica desta região demonstra uma reação inflamatória crônica, constituída de linfócitos, plasmócitos e macrófagos parasitados, sugerindo um caráter imunomediado (ROZE, 2004). Outros autores (PEÑA et al., 2000; Di PIETRO et al., 2016) aventam a possibilidade desta lesão ser decorrente de reação local provocada pela inoculação do parasito pelo vetor, também chamado de cancro de

inoculação.

A conjuntiva é uma estrutura rica em tecido linfoide com função imunológica essencial para a higidez ocular (HENDRIX, 1999). Acredita-se que, por estas características, a presença de inflamações na conjuntiva bulbar, palpebral, e membrana nictitante sejam frequentes (BRITO et al., 2010; FULGÊNCIO, 2006; KOUTINAS et al., 1999; MOLLEDA et al., 1993; SLAPPENDEL, 1988; ROZE, 2004).

As lesões envolvendo a córnea em cães com leishmaniose são raras e normalmente estão associadas com outros processos como as ceratoconjuntivites e ceratouveítes (ROZE, 2004). No entanto, edema endotelial difuso evoluindo para uma córnea azulada, vascularização, pigmentação, perda da transparência, e ocasionalmente distrofias calcárias e lipídicas, podem ser encontradas secundárias à reação inflamatória (SAHUQUILLO, 2005). Brito et al. (2007) relata um caso de cão com ceratite ulcerativa superficial, no qual foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania sp.* isoladas por citologia a partir da ferida.

Lesões nodulares granulomatosas podem ser encontradas na lateral do limbo, semelhante a uma episclerite granulomatosa, normalmente estando relacionada com a presença de parasito no local, diagnosticado por citologia (Di PIETRO et al., 2016).

As manifestações clínicas do segmento posterior são raramente descritas (GALLEGO et al., 1986; MOLLEDA et al., 1993; PEÑA et al., 2000; ROZE, 2004) devido à baixa predileção do parasito, e pela dificuldade em se obter um exame de fundo de olho detalhado quando muitas vezes há uma opacidade de segmento anterior.

Segundo Garcia-Alonso et al. (1996), ao analisarem as estruturas oculares histologicamente, relataram presença de infiltrado inflamatório e macrófagos com a forma amastigota do parasita nos tecidos, sendo esta última não encontrada em todas as estruturas oculares. A presença do parasita no

tecido intra-ocular se deve, possivelmente, à quebra da barreira sangue-humor aquoso do olho, com a passagem de macrófagos parasitados para a câmara anterior.

Infiltrado inflamatório e formas amastigotas foram observados na conjuntiva ocular, limbo, corpo ciliar, íris, córnea, esclera e ângulo iridocorneal, coroide e bainha do nervo ótico dos animais infectados. Nos animais que não foram submetidos ao exame histopatológico, lesões oculares foram registradas em três olhos com sinais de atrofia de retina (PEÑA et al., 2008).

Não foram observadas alterações e presença do parasita somente no nervo ótico e na retina segundo estudo realizado por Brito et al. (2010). Porém, foi descrito em seu estudo com cães portadores da doença, que a coroide e a retina apresentavam congestão vascular, com a presença de células inflamatórias entre as camadas de fibras nervosas do nervo ótico e células ganglionares, ou mesmo nas camadas mais internas da retina, sugerindo um quadro de coriorretinite (BRITO et al., 2010). McConnell et al. (1970) relataram o isolamento de *L. donovani* no humor vítreo em um cão.

Molleda et al., (1993) avaliaram 41 cães naturalmente infectados na Espanha e diagnosticaram 80,5% de animais com oftalmopatias, e as alterações do segmento posterior, quando referidas, traduziram-se na atrofia de retina (4,9%) e atrofia do nervo ótico (2,4%).

Ainda foram relatadas, por alguns autores, uveíte posterior, coriorretinites, descolamento de retina, e hemorragias de segmento posterior (CIARAMELLA et al., 1997; GARCIA-ALONSO et al., 1996; MCCONNELL et al., 1970; PEÑA et al., 2000; ROZE, 2004). Peña et al. (2000) encontraram uma prevalência de 3,8% de uveítes do segmento posterior, enquanto que Roze, (2004) descreveu 8 casos de uveítes com coriorretinite multifocal e em um animal com descolamento exsudativo de retina.

Fulgêncio (2006) em seu estudo, relatou que o segmento posterior dos olhos dos cães avaliados possivelmente foi acometido por uma extensão de

processos inflamatórios da úvea anterior, pois todos os animais com uveíte posterior também apresentavam inflamação importante de íris e/ou corpo ciliar, caracterizando panuveíte. Nos animais em que foi possível a avaliação dos meios intraoculares, o autor notou coriorretinite em dois animais do estudo.

1.4 Segmento posterior e fundo de olho em cães

O olho é um órgão elaborado cuja função primária é colher e focalizar luzes sobre a retina fotossensível. Ele se encontra dentro de uma cavidade da cabeça em forma de cone, a órbita, que aloja o bulbo do olho e várias outras estruturas do tecido mole e os anexos oculares (LEITE et al., 2013).

A constituição do olho é formada por três túnicas dispostas concentricamente: a camada externa (túnica fibrosa), composta por esclera e córnea; a camada média (túnica vascular), composta pela coroide, corpo ciliar e íris; e a camada interna (túnica nervosa), composta pela retina e nervo ótico (LEITE et al., 2013). Fazem parte do segmento posterior do olho o humor vítreo, a retina e a coroide.

Além desses envoltórios, o olho apresenta o cristalino ou lente, sendo uma estrutura biconvexa transparente que é mantida na sua posição pelos ligamentos zonulares, que se inserem sobre um espessamento da camada média, que o recobre em parte, a íris (LEITE et al., 2013).

A retina é a estrutura mais complexa do olho, convertendo a energia luminosa em energia química para gerar o sinal elétrico que é conduzido ao cérebro (LEITE et al., 2013). Junto com o nervo ótico, são derivados de projeções cerebrais, conseqüentemente sua morfologia e fisiologia são similares. A retina consiste de uma camada interna e outra externa. A camada externa (*pars ceca*) é formada pelo epitélio pigmentar, que se estende para fora da papila, sobre o corpo ciliar e a superfície posterior da íris até a margem da

pupila. O epitélio pigmentar faz limite com a coroide, por meio da membrana de Bruch. A camada interna da retina é a parte neural ou sensorial (*pars optica*). Ela se estende da junção do corpo ciliar até a papila ótica e continua como nervo ótico (BEDFORD, 2009). Apenas dois terços posteriores da retina podem ser atingidos pela luz que entra na pupila (LEITE et al., 2013).

A estrutura da retina é classificada em dez camadas, sendo do exterior (esclera) para o interior (vítreo): epitélio pigmentado retiniano (ausência de pigmento na região tapetal), camada de fotorreceptores cones e bastonetes, membrana limitante externa, camada nuclear externa (corpos celulares dos fotorreceptores), camada plexiforme externa (sinapse entre os axônios dos fotorreceptores e os dendritos das células bipolares e horizontais), camada nuclear interna (corpos celulares das células bipolares, horizontais, amácrimas e de Muller), camada plexiforme interna (sinapse entre as células da camada nuclear interna e as células ganglionares), camada de células ganglionares (camada única de células, cujos axônios formam o nervo ótico), camada de fibras nervosas (axônios das células ganglionares) e a membrana limitante interna (separa a retina do vítreo) (LEITE et al., 2013).

Os vasos sanguíneos retinianos são visíveis através de um oftalmoscópio na superfície da retina. É uma rede de artérias e veias que penetram a retina através do disco ótico, e proporcionam uma maior nutrição retiniana, sendo o restante da nutrição oriundo dos vasos da coroide (LEITE et al., 2013).

Os axônios das células ganglionares da retina saem do olho pelo disco ótico para formar o nervo ótico, sendo esse geralmente arredondado, mas podendo ser elítico. Nessa região não existem fotorreceptores, tornando a região completamente cega (LEITE et al., 2013).

O nervo ótico é um nervo craniano formado a partir do disco ótico, rico em axônios das células ganglionares retinianas, sendo esse responsável por

conectar a retina aos centros visuais e não visuais do cérebro (LEITE et al., 2013).

A informação visual é transportada por ambos os nervos óticos e o quiasma ótico (50% até 95% de cruzamento), até os corpos geniculados laterais no tálamo e daí para o córtex cerebral caudal (BEDFORD, 2009).

O segmento posterior deve ser examinado com auxílio da oftalmoscopia direta e indireta em sala escura. O exame, dependendo da opacidade de meios, avalia tamanho, forma e coloração do disco ótico. Deve-se examinar a vasculatura retiniana, avaliando número, calibre e distribuição dos vasos. Se os vasos coroidais forem visíveis, estes também devem ser observados. A área tapetal é avaliada quanto à refletividade, se está atenuada ou aumentada, e a área não-tapetal é avaliada quanto à pigmentação (GOMES et al., 2013).

Retinopatias são condições que podem estar relacionadas a uma variedade de causas, podendo ser classificadas como hereditárias, adquiridas, de etiologias específicas e ainda de causas desconhecidas. Dentre as adquiridas, pode ser resultado de infecções virais, bacterianas, fúngicas, por protozoários ou parasitárias, assim como a partir de alterações imunológicas ou endocrinopatias. Ainda são consideradas como causas: anemia, distúrbios nutricionais e distúrbios cardiovasculares, como a hipertensão (BALICKI et al., 2013).

A inflamação da úvea anterior e coroide pode ser resultado de danos celulares diretos dados por agentes infecciosos, químicos, físicos. Danos adicionais podem ocorrer secundários ao processo inflamatório por ação de mediadores químicos liberados pelas células em degeneração. As prostaglandinas são mediadores poderosos na inflamação intraocular, gerando quebra da barreira hematoaquosa e os sinais clínicos da uveíte. A inflamação da coroide pode resultar na exsudação de fluido e células no espaço sub-retiniano, com descolamento seroso de retina, resultando em coriorretinite (VAN DER WOERDT, 2001). Durante o processo inflamatório, a

permeabilidade capilar é aumentada, permitindo que células e proteínas possam migrar para o humor aquoso e vítreo, resultando em um aumento da resposta inflamatória e deposição de imunocomplexos (ORIÁ et al., 2004).

De acordo com Oriá, et al. (2004), pacientes com erliquiose podem ter acometimento de lesões ao segmento posterior, com formação de papiledema e coriorretinite. Neurite ótica, ingurgitamento dos vasos sanguíneos da retina e hemorragia papilar podem estar presentes. Tortuosidade dos vasos sanguíneos e lesões coriorretinianas são caracterizadas por áreas pigmentadas e hiperrefletividade.

Em quadros de retinopatias, quando diagnosticados durante o curso de coriorretinite ativa e uveíte posterior, nota-se edema retiniano como áreas opacas. Edema retiniano e exsudato estão presentes ao redor de vasos sanguíneos. Devido o infiltrado celular, áreas de hiporrefletividade podem se formar no fundo do olho na zona tapetal ou não tapetal. A inflamação ativa ainda pode ser acompanhada de hemorragia e descolamento de retina (BALICKI et al., 2013; VAN DER WOERDT, 2001). O vítreo geralmente tem uma aparência nebulosa secundária à exsudação de células no vítreo (VAN DER WOERDT, 2001).

A coriorretinite inativa é uma área claramente distinta, com hiperrefletividade em que, muitas vezes, há acúmulo de pigmento preto no centro, sendo uma lesão provável de cicatriz resultante da coriorretinite focal anterior. Esse acúmulo de pigmento é causado pela proliferação do epitélio pigmentar da retina, enquanto a hiperrefletividade é oriunda da atrofia retiniana (BALICKI et al., 2013; ORIÁ, et al., 2004).

Em estudo descrito por Oriá et al. (2004) com cães infectados experimentalmente com *Ehrlichia canis*, observam-se vasos retinianos dilatados durante a fase febril inicial. Esta fase era seguida de regressão da congestão vascular, com desenvolvimento simultâneo das lesões perivasculares na zona tapetal e não tapetal. Mais tarde, as lesões reduzem em tamanho, tornando-se

discretas, ou eram substituídas por áreas de intensa hiperrefletividade semelhante à observada na atrofia progressiva da retina (PRA), mas sem a atenuação vascular típica.

A vasculite é definida como uma inflamação da parede do vaso sanguíneo juntamente com necrose, que ocorre decorrente de uma resposta imune anormal, conduzindo à destruição e oclusão dos vasos, resultando em uma fraca perfusão e isquemia do órgão final. Quando acomete o olho, a vasculite retiniana é a mais comum, devido uma maior susceptibilidade desses vasos à inflamação (AZAD et al., 2016). Segundo ORIÁ et al. (2004), as vasculites são oriundas de depósitos de imunocomplexos na parede vascular, juntamente com o aumento da pressão oncótica, além da disfunção plaquetária, propiciando hemorragia ocular.

1.5 Sistema visual e Eletroretinografia (ERG)

O sistema visual capta a luz e foca sobre os fotorreceptores, transdutores que convertem a luz em impulsos elétricos para a passagem da luz ao córtex visual, no qual a sensação da visão ocorre. Mecanismos homeostáticos e anatômicos, que refinam e protegem o sistema, variam entre as espécies, dependendo das suas necessidades funcionais (LEITE et al., 2013).

A informação elétrica gerada pela exposição de fotorreceptores à luz sofre processo neural inicial dentro da retina. Essa informação deixa o olho pelo nervo ótico, em cujas fibras estão os axônios das células ganglionares da retina. A maioria dos axônios do nervo ótico faz sinapse no tálamo, e a partir daí, a informação visual caminha para o córtex visual primário no lobo occipital do cérebro para a percepção consciente (LEITE et al., 2013).

Os fotorreceptores podem ser divididos em bastonetes (finos) e cones (grossos). Os bastonetes são mais sensíveis à luz e ao movimento,

responsáveis para ver em ambientes de luz fraca (visão escotópica). Estão presentes em maior concentração externamente à área central. Os cones são menos sensíveis à luz e são responsáveis pela diferenciação de detalhes e cores (visão fotópica), estando em maior concentração na área central, exatamente temporal ao disco ótico. Cães e gatos possuem maior densidade de bastonetes que primatas, garantindo a eles melhor visão em pouca luz (BEDFORD, 2009).

Os bastonetes e os cones são compostos de segmentos externos, segmentos internos, núcleo e terminais sinápticos. Os segmentos internos são considerados a fonte de energia, fornecendo rodopsina e outros pigmentos visuais, via ciclo rodopsina-retinina-vitamina A, para os discos nos segmentos externos. Esses discos, preenchidos com pigmentos luminosos, crescem na direção do epitélio pigmentar. Os segmentos externos, especialmente dos bastonetes, ficam embebidos no epitélio pigmentar, de onde a energia necessária é suprida via capilares e por meio dos quais as placas gastas são dissolvidas e reabsorvidas (BEDFORD, 2009).

Potências elétricas podem ser geradas em partes da retina pela exposição a estímulos luminosos (bastonetes e cones: onda A; camada nuclear interna: onda B; epitélio pigmentar: onda C; cones: onda D). Estes podem ser gravados na forma de eletrorretinografia (ERG) (BEDFORD, 2009).

Eletrorretinograma (ERG) é a onda polifásica retiniana obtida em resposta ao estímulo luminoso. Essa resposta é complexa, pois é resultado do conjunto da atividade de milhões de células retinianas. É considerado um exame de grande importância por se tratar de um meio diagnóstico objetivo, não invasivo e capaz de avaliar a resposta retiniana, detectando precocemente lesões nas suas camadas mais externas (SAFATLE et al.; 2010). Esse exame fornece informações sobre a atividade sensível à luz dos fotorreceptores, do epitélio pigmentar e das células transmissoras (BEDFORD, 2009), porém não é um instrumento para avaliar a visão ou a acuidade visual, já que a função

retiniana pode apresentar-se normal, mesmo na ausência de visão, como por exemplo, em casos de cegueira cortical (EYHERABIDE, 2016).

É uma exame utilizado de forma mais ampla e difundida na medicina humana, sendo seus procedimentos padronizados pela primeira vez em 1989, pela “Internacional Society for Clinical Electrophysiology of Vision” (ISCEV), sendo recentemente atualizados em 2015 (EYHERABIDE, 2016).

A luz, ao incidir nos cones e nos bastonetes, é absorvida pelas moléculas de pigmentos ali situados, isomerando-as. Essa isomerização promove a liberação dos íons Ca^{2+} , os quais obstruem os poros das membranas de fotorreceptores. A entrada de Na^{+} fica impedida e o fotorreceptor se hiperpolariza resultando na primeira deflexão negativa do eletrorretinograma, denominada de onda “a”. Esta mesma hiperpolarização provoca também uma modificação na concentração dos transmissores liberados pela camada plexiforme externa, o que, por sua vez, condiciona uma alteração na polarização da célula bipolar. A liberação dos íons de K^{+} pelas células bipolares induzirá à despolarização das células de Muller, resultando na onda positiva do eletrorretinograma, denominada onda “b”. A seguir, ocorre absorção dos íons de K^{+} pelas células de Muller e bipolares, diminuindo sua concentração no compartimento extracelular, determinando o aparecimento da onda “c” do eletrorretinograma (GONÇALVES et al., 2000).

A onda “c” tem sua origem no epitélio pigmentado da retina, entretanto, devido às condições usadas na medicina veterinária, a onda “c” é raramente detectada (WEICHSLEER; HERRERA, 2007).

Existem várias indicações para a realização deste exame em cães, porém as mais comuns são: avaliação pré-cirúrgica de pacientes com catarata, caracterização de distúrbios que causam cegueira, como o glaucoma, acromatopsia, displasia retiniana, retinopatias degenerativas, hipoplasia do nervo ótico, degeneração retiniana repentina adquirida e lipofuccinose ceróide neuronal (SAFATLE et al.; 2010).

Estudos em cães demonstram que quanto mais jovens os animais, maiores são as amplitudes e, quanto mais velhos, menores são as amplitudes das respostas, semelhante ao que ocorre no ERG humano (SAFATLE et al., 2010).

Segundo estudo realizado por Balicki et al. (2013) com avaliação de fundoscopia e eletrorretinografia em cães pastores alemão policiais submetidos a esforços físicos e estresse, os registros de eletrorretinografia em olhos com sinais de coriorretinite inativa, mostraram função prejudicada de cones, com menor amplitude da onda b e tempos implícitos prolongados.

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) representa um desafio ao clínico veterinário, pela presença de animais assintomáticos, pela diversidade das manifestações clínicas e pela dificuldade em se obter uma prova diagnóstica que ofereça 100% de sensibilidade e especificidade (FERRER, 1992).

Provas laboratoriais utilizando métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares estão disponíveis com o intuito de confirmar a infecção, enfermidade, e infectividade para flebotomíneos (BRIFFOD, 2011; FERRER, 1992). Dentre os exames sorológicos, podem ser citados imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e teste de aglutinação direta. Entretanto, estudos mostram que, em áreas endêmicas, alguns animais infectados apresentam resposta negativa à sorologia (AGUIAR et al., 2007).

A identificação do parasita pode ser realizada especificamente em material obtido de medula óssea, baço, fígado, linfonodo e pele, tanto pela histopatologia ou por esfregaços confeccionados por punção biópsia aspirativa (PBA) e corados por Giemsa ou panótico rápido (GENARO et al., 1993).

A visualização de formas amastigotas em esfregaços de PBA 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 (GRADONI, 2002).

Os métodos baseados em reação cadeia pela polimerase (PCR) fornecem um padrão ouro para diagnóstico de casos ativos, cura parasitológica, como também detectar infecções em hospedeiros vertebrados ou vetores (MANNA et al., 2008).

Nos últimos anos, o PCR qualitativo ou quantitativo através de material obtido de suabe conjuntival, vem se tornando cada vez mais popular para o diagnóstico da LVC por ser um método não invasivo e que apresenta alta sensibilidade e especificidade (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; STRAUSS-AYALI et al., 2004). A sensibilidade é aumentada quando colhe-se material de ambos os olhos, com valores acima de 90% (STRAUSS-AYALI et al., 2004). É considerada não só uma ferramenta de diagnóstico, mas também no monitoramento e estudos epidemiológicos da doença. A eficiência do PCR convencional foi aumentada com a utilização do PCR em tempo real, pois produz resultados rapidamente, reduzindo as várias etapas de manipulação do pós-PCR e, dessa forma, reduzindo os riscos de contaminação da amostra e possíveis resultados falsos-positivos (BENASSI, 2015).

A elevação das proteínas plasmáticas totais com inversão da relação albumina/globulina; hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia é vista na maioria dos animais com doença clínica (BRIFFOD, 2011; MAGNO, 2007; NOGUEIRA, 2007). Esta hipergamaglobulinemia sugere uma resposta imune exacerbada que é ineficiente, podendo causar a síndrome da hiperviscosidade sanguínea (ANDEREG, 1999).

Esses achados de hematologia são vistos também na erliquiose canina, onde o aumento da pressão oncótica relacionada à hiperproteinemia e a

hiperviscosidade poderiam causar retinopatia hipertensiva e hifema nos pacientes acometidos por essa doença (ORÍÁ et al., 2004).

1.7 Tratamento

Todos os medicamentos conhecidos para tratamento de leishmaniose usados em cães podem levar à remissão temporária ou permanente dos sinais clínicos, mas nenhum é suficiente para eliminar a infecção. A maioria dos protocolos terapêuticos foi desenvolvida por estudos clínicos em humanos e, posteriormente, adaptada a cães, muitas vezes sem informação farmacocinética suficientemente relevante para cães (OLIVA et al., 2010).

Em cães, os objetivos do tratamento são induzir à redução da carga parasitária, tratar as lesões promovidas pelo parasita nos órgãos, restaurar uma resposta imune eficiente e melhorar o quadro clínico do paciente, evitando recaídas (OLIVA et al., 2010).

O tratamento da leishmaniose visceral é baseado na utilização de antimoniatos pentavalentes e anfotericina B, nos humanos. Porém, cães infectados que recebem a terapêutica leishmanicida permanecem como hospedeiros reservatórios permitindo a propagação e disseminação da doença pelos canídeos e homem (GREENE, 2006). Assim, em relação aos animais, a Organização Mundial da Saúde recomenda o sacrifício dos animais infectados. Esta ação tem sido questionada por alguns estudiosos alegando que, em estudos experimentais, a eliminação canina não diminui a incidência da infecção humana.

O controle da transmissão da *Leishmania* é uma necessidade urgente. As medidas de controle vetorial são difíceis com o uso de inseticidas ativos por serem proibidos ou pelo fato de os mosquitos já haverem desenvolvido resistência (MANNA et al., 2009).

Uma abordagem integrada do controle de leishmaniose visa a

combinação de medicamentos ao uso de colares a base de deltametrina, para reduzir a infecção em vetores. No entanto, o controle médico de infecções de cães representa um problema grave, uma vez que não existem estratégias de diagnóstico e tratamento precoce (MANNA et al., 2009).

O alopurinol é um fármaco inibidor da enzima conversora da hipoxantina que é administrado oralmente, sendo metabolizado pelo parasita que produzirá um análogo inativo de inosina, que é incorporado pelo RNA da *Leishmania*, causando tradução defeituosa das proteínas. É amplamente utilizado para o tratamento da Leishmaniose como monoterapia ou combinada com antimoniais pentavalentes, devido à sua toxicidade relativamente limitada. Apresenta grandes benefícios, como eficácia na melhora clínica, baixo custo e administração oral. É comumente utilizado na dose de 10 a 30 mg/kg/dia para terapia de manutenção a longo prazo. Efeitos colaterais são incomuns. Em cães, sua eficácia produzindo remissão clínica, é semelhante à dos antimoniais pentavalentes, embora ambos os fármacos, usados isoladamente ou em combinação, não erradicam o parasita (MANNA et al., 2009).

O uso do alopurinol no tratamento de leishmaniose canina como monoterapia durante 2 a 3 meses, geralmente leva à moderada melhora clínica e restauração parcial de algumas alterações laboratoriais, porém não resulta em cura parasitológica completa e recaídas acontecem quando o tratamento é interrompido. É considerado um medicamento com boa tolerância e parece retardar a deterioração da função renal (OLIVA et al., 2010).

Em estudo realizado por Di Pietro et al.(2016), que utilizou antimoniato de N-metilglucamina combinado ao alopurinol, promoveu a cura da lesão ocular em cerca de metade dos casos (48%), relatando um prognóstico favorável para as lesões de anexos e para a maioria das lesões inflamatórias intra-oculares, com exceção das uveítes anteriores, que muitas vezes é refratária a terapia antiprotzoária.

A miltefosina, um alquifosfolípideo originalmente desenvolvido como um agente antineoplásico oral, é uma molécula muito estável, relativamente segura e altamente eficiente, sendo um novo fármaco para o tratamento da LV humana (MANNA et al., 2008; MANNA et al., 2009). É considerado um medicamento tóxico para o parasita *Leishmania* e mostra efeitos imunostimuladores, pois melhora as células T e ativa macrófagos e a produção de microbicidas (MANNA et al., 2008). Estudos recentes, tem-se observado uma boa resposta à miltefosina em camundongos e humanos, mas complicações graves, como trombocitopenia foram observadas em vários pacientes. Manna et al. (2009) e Sindermann, Engel (2006) também citam que a medicação possui um alto custo e que tem potencial teratogênico, além de distúrbios gastrointestinais em humanos.

Em um estudo com ratos e cães tratados 52 semanas com miltefosina, observaram-se uma dose e tempo dependentes para o desenvolvimento de degeneração de retina nos ratos, afetando principalmente o epitélio pigmentar, onde alterações precoces mostraram ser reversíveis após descontinuação do tratamento. Em contraste, os cães não mostraram descobertas semelhantes na retina, mesmo após tratamento em longo prazo, com doses máximas bem toleradas (SINDERMANN; ENGEL; 2006).

Em olhos de humanos que eram submetidos ao tratamento de câncer com miltefosina na dose de 150mg/dia, uma avaliação mais detalhada, incluindo eletrorretinografia, mostrou que o fármaco não promoveu qualquer tipo de toxicidade ocular, mesmo depois de vários meses de tratamento (SINDERMANN; ENGEL; 2006).

Segundo Manna et al. (2009), a combinação de miltefosina e alopurinol representa uma boa opção de protocolo terapêutico para a leishmaniose visceral canina, controlando e retardando a progressão da doença. Os resultados observados por PCR em tempo real foram similares ao encontrados clinicamente. Um aumento da carga parasitária foi observado nos

tecidos três a quatro meses após a terapêutica combinada, que foi concomitante com o reaparecimento dos sinais clínicos dentro dos 6 meses pós terapia. Com isso, foram necessários outros ciclos para tratamento da carga residual, mantendo-se o alopurinol a longo prazo.

Em estudo realizado na Índia com 120 pacientes humanos com leishmaniose visceral tratados com miltefosina, 95% dos pacientes se apresentaram curados durante seis meses após a realização do tratamento, sendo que nenhum paciente teve descontinuidade do mesmo decorrentes de efeitos colaterais gastrintestinais (JHA et al., 1999). Achados semelhantes de cura clínica e parasitológica em seres humanos medicados com miltefosina foi descrito por Oliva et al. (2010).

O uso da miltefosina na terapia de leishmaniose deve ser cuidadosamente considerado. Conforme demonstrado pelo uso prévio de fármacos antimoniais em cães e seres humanos, os mesmos podem levar à resistência. Para substâncias como a miltefosina, de meia-vida longa e uma propensão à seleção de formas resistentes, o controle rigoroso da dosagem diária e a conclusão de um tratamento, é essencial. Os métodos baseados em PCR fornecem o padrão ouro em diagnóstico (MANNA et al., 2009; OLIVA et al., 2010).

De acordo com resultados apresentados por Manna et al. (2009), o PCR em tempo real mostrou que a miltefosina em associação com o alopurinol atuou fortemente na replicação da *Leishmania*, mas não conseguiu eliminar o parasita dos gânglios linfáticos. Isso pode representar uma das causas potenciais de recidiva da doença. Curiosamente, em todos os grupos estudados, o PCR em tempo real demonstrou irregularidade de resultados no sangue. Sendo assim, o sangue não parece ser um substrato adequado para quantificação de DNA parasitário. Resultados semelhantes foram descritos por Manna et al. (2008) no tratamento com miltefosina utilizada como terapia única.

Outros fármacos, além de alopurinol e miltefosina, são descritos no tratamento de leishmaniose visceral canina, como aminosidina, anfotericina B,

pentamidina, espiramicina em associação ao metronidazol, marbofloxacina, enrofloxacina e domperidona (OLIVA et al., 2010).

No Brasil, a miltefosina, de uso exclusivamente veterinário, com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e atualmente aprovada e liberada pelo BRASIL, pela Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, permite o registro do produto Milteforan®, sob número SP 000175-9.000003, de propriedade da empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL, indicado para o tratamento da leishmaniose visceral em cães.

Essa pesquisa buscou avaliar e descrever as principais alterações clínicas e eletrorretinográficas observadas no segmento posterior de olhos de cães com leishmaniose visceral, antes e após o tratamento com miltefosina, uma vez que não existem relatos científicos no Brasil.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, P. H. P.; et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v. 8, n. 4, p. 283-294, 2007.

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, 2004.

ANDEREG, P.I.; PASSOS, L.M.F. Erliquiose canina – revisão. **Clín. Vet.**, n. 19, p. 31-38, 1999.

AZAD, S.V.; TAKKAR, B.; VENKATESH, P. Eye and vasculitis. **J. Vasc.**, v. 2, n. 2, p. 108. doi: 10.4172/2471-9544.100108

BALICKI, I.; NESTOROWICZ, N.; OFRI, R. Funduscopy abnormalities and electroretinography in cases of retinopathy in German Shepherd dogs. **Vet. Ophthalmol.**, v. 16, n. 6, p. 397–408, 2013. doi: 10.1111/vop.12007

BEDFORD, P.G.C. Afecções de retina. In: LAUS, J.L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e em gatos**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2009. Cap. 8, p. 169-187.

BENASSI, J.C. **Detecção de *Leishmania spp.* por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos**. 2015 (Dissertação) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2015. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74135/tde13102015.../ME7348626COR.pdf>. Acesso em: 01 jul de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** – Brasília – Brasil: MS, 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf>. Acesso em: 23 de out 2017.

BRIFFOD, C. **Revue actuelle en matiere de leishmaniose canine**. These d'exercice (Médecine vétérinaire) – Universidade de Toulouse, 2011. Disponível em: <http://oatao.univ-toulouse.fr/4968/1/briffod_4968.pdf>. Acesso em: 23 de set 2017.

BRITO, F. et al. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 5, p. 768-775, 2006.

BRITO, F. et al. Amastigota forms resembling *Leishmania sp.* on corneal ulceration in a dog: case report. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n. 1, p. 81-84, 2007.

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

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 141, n. 21, p. 539 - 543, 1997. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/13817372_A_retrospective_clinical_study_of_canine_leishmaniasis_in_150_dogs_naturally_infected_by_Leishmania_infantum>. Acesso em: 23 de ago 2017.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151 - 156, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00364665200600030007>. Acesso em: 12 de fev 2017.

DAY, M.J. Implications of the immune system during infection by leishmania organism in canine. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS. **Proceedings...** Itália, 2004.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 305 - 318, 2004. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004

Di PIETRO, S.; et al. Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and ownedclient dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. World**, v. 9, n. 6, p. 633-637, 2016. doi: 10.14202/vetworld.2016.633-637

EYHERABIDE, A.R. **Padronização do eletrorretinograma de campo total em cães da raça Yorkshire Terrier**. 2016. (Dissertação) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10137/tde-03102016-100114/pt-br.php>>. Acesso em: 21 de jan 2018.

FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Rec.**, v. 136, p. 514-516, 1995. doi: 10.1136/vr.136.20.514

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

FONDATI, A.; FONDEVILA, D. Dermatological aspects of canine leishmaniosis: clinical and histopathological cases. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS, 1, 2004. Napoli. **Proceedings...** Napoli: [s.n], 2004. p. 39-41.

FULGÊNCIO, G. O. **Prevalência de oftalmopatias em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* no município de Belo Horizonte – estudo clínico e histopatológico**. 2006. (Dissertação) - Escola de Veterinária; Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. Disponível em:

<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MASA7BALM4/disserta__o_gustavo_de_oliveira_fulg_ncio.pdf?sequence=1>. Acesso em: 10 de mai 2017.

GALLEGO, E.; et al. Certain aspects of ocular lesions in canine visceral leishmaniasis. In: MEETING OF VETERINARY PATHOLOGIST, 4., 1986. **Proceedings...** Córdoba: European Society of Veterinary Pathology, 1986. p. 79.

GARCIA-ALONSO, M.; et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 18, p. 617-623, 1996. doi: 10.1046/j.1365-3024.1996.d01-39.x

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

GOMES, D.; et al. Atrofia progressiva generalizada de retina em cães da raça Cocker Spaniel. **Ciênc. Rural**, v. 43, n. 8, p. 1405-1414. 2013. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384782013000800011&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 12 de abr 2018.

GONÇALVES, E. R.; et al. Eletrofisiologia ocular. In: CONSELHO BRASILEIRA DE OFTALMOLOGIA. **Retina e vítreo: clínica e cirurgia**. São Paulo: Roca, 2000. p. 185-225.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002. Sevilla: **Intervet**, 2002. p.7-14.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, 2005. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.07.001

GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat: Leishmaniasis**. 3ª ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p. 685-698.

HENDRIX, D.V.N. Diseases and surgery of canine conjunctiva. In: GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 3th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, Baltimore 1999. Cap. 18, p. 619-634.

JHA, T.K; et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **New Engl. J. of Med.**, v. 341, p. 1795-1800, 1999. doi: 10.1056/NEJM199912093412403

KOUTINAS, A.F.; et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 35, n. 5, p. 376-383, 1999. doi: 10.5326/15473317-35-5-376

LEITE, A.G.B.; OLIVEIRA, D.; BARALDI-ARTONI, S.M. Morfologia do sistema ocular dos animais domésticos. **Ars Vet.**, Jaboticabal, SP, v. 29, n. 1, p. 42-51, 2013. Disponível em: <<http://arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/viewFile/504/831>>. Acesso em 23 de mar 2018.

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. 2007. (Dissertação) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/SAGF-765GJ2>>. Acesso em: 23 de nov 2017.

MANNA, L.; et al. Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1149, p. 358-360. 2008. Disponível em: <<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/toc/17496632/1149/1>>. Acesso em: 21 de fev 2017.

MANNA, L.; et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. **Vet. J.**, v. 182, p. 441-445. 2009. Disponível em: <http://www.academia.edu/22746181/Study_of_efficacy_of_miltefosine_and_allopurinol_in_dogs_with_leishmaniasis>. Acesso em: 10 de out 2017.

McCONNELL, E. F.; et al. Visceral leishmaniasis with ocular involvement in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 156, p. 197-203, 1970. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19702203366>>. Acesso em 10 de out 2017.

MOLLEDA, J.M. et al. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. **Isr. J. Vet. Méd.**, v.48, p.173-178, 1993.

NARANJO, C. et al. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 133, p. 37-47, 2005. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.05.017

NOGUEIRA, F.S. **Avaliação clínico-laboratorial de cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral, submetidos à terapia com anfotericina B.** 2007. (Tese) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/101315/nogueira_fs_dr_boftm.vz.pdf;jsessionid=AB9D4F7D4EE73A837A410080B7369307?sequence=1>.

Acesso em 23 de maio de 2017.

NOVALES, M. **Aportaciones al estudio de las alteraciones oculares en la leishmaniasis canina.** 1991. 380 f. (Tesis Doctoral) - Facultad de Veterinaria de Córdoba, 1991.

OLIVA, G.; et al. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 236, n.11, p. 1192-1198, 2010. doi: 10.2460/javma.236.11.1192

OLIVER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune responses: a signaling point of view. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005. doi: 10.1128/CMR.18.2.293-305.2005

ORIÁ, A.P.; PEREIRA, P.M.; LAUS, J.L. Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Ciênc. Rural.** Santa Maria, v.34, n.4, p.1289-1295, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n4/a55v34n4.pdf>>. Acesso em: 10 de fev 2017.

PEÑA, M.T.; et al. Histopathological features of ocular leishmaniasis in the dog. **J. Comp. Path.**, v. 138, p. 32-39, 2008. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.09.004

PEÑA, 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. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/11942863_Ocular_and_periocular_manifestations_of_leishmaniasis_in_dogs_105_Cases_1993-1998>. Acesso em: 12 de fev 2017.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.M.G.; RUITENBERG, E.J. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, **Proceedings...** Barcelona, Spain: Killick-Hendrick, 1999. p. 60-64.

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

ROZE, M. Ophthalmologic implications in leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CONGRESSON CANINE LEISHMANIASIS, 2004. Nápolis, **Anais...**, Napolis: [s.n], 2004. p. 73-77.

SAFATLE, A. M.V.; et al. Determinação dos valores normais do eletrorretinograma de campo total em cães da raça Poodle portadores de catarata de acordo com a faixa etária. **Ciênc. Rural**. Santa Maria. v. 40, n. 3, p. 587-593. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384782010000300014&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em 12 de setembro de 2017.

SAHUQUILLO, C. Manifestaciones oculares en la leishmaniosis canina. **Inf. Vet.**, n. 8, p.39-43, 2005.

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.

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, Suppl. 1, pages S17–S20, 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/100/Supplement_1/S17/1885883>. Acesso em: 10 de out 2017.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious disease of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1988. p.450-458.

SOLANO-GALLEGO, L.; et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol.**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2001. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine visceral Leishmaniosis. In: CHARMICHAEL, L. **Recent advances in canine infectious diseases**. Ithaca: International Veterinary Information Service. 2004, p. 1-14.

TRONCARELLI, M.Z.; et al. Análise clínica e laboratorial em cães eutanasiados no centro de controle de zoonoses de Bauru-SP, com vistas ao diagnóstico da Leishmaniose visceral (LV). **Vet. Zootec.**, v. 16, n. 2, p. 343-353, 2009.

WEICHSLER, N.; HERRERA, D. Electrorretinografia: uso clínico. In: HERRERA, D. **Oftalmología clínica en animales de compañía**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2007. p. 73-83.

VAN DER WOERDT, A. Management of intraocular inflammatory disease. **Clin. Tech. Small Anim. Pract.**, v. 16, n. 1, p. 58-61, 2001. doi: 10.1053/svms.2001.22807

CAPÍTULO 2 – ACHADOS FUNDOSCÓPICOS E DE ELETORRETINOGRRAFIA DE CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL, SUBMETIDOS À TERAPIA COM MILTEFOSINA.

RESUMO - A leishmaniose visceral (LV) canina caracteriza-se por uma enorme variabilidade de manifestações clínicas, dentre elas, lesões dermatológicas e oculares. Poucos são os estudos com as alterações do segmento posterior de olhos de cães acometidos pela doença, devido, principalmente, à opacidade do segmento anterior. O objetivo do trabalho foi avaliar e descrever as principais alterações fundoscópicas e eletrorretinográficas observadas em cães naturalmente acometidos por LV, antes e após o tratamento com a miltefosina. Foram selecionados oito cães, que não apresentavam outras doenças infecciosas ou vasculares, e apresentassem meios oculares transparentes. Utilizaram-se registros fotográficos do segmento posterior e a avaliação da funcionalidade da retina através da eletrorretinografia (ERG). Os achados de fundoscopia incluíram atenuação vascular, hiperrefletividade, pigmentação retiniana, embainhamento vascular, hiperpigmentação peripapilar, hemorragia sub-retiniana, turbidez vítrea, papiledema e tortuosidade vascular. Todos os animais se beneficiaram clinicamente da terapêutica medicamentosa, não sendo mais encontradas hemorragia sub-retiniana e turbidez vítrea após tratamento, e somente um animal permanecia com a lesão embainhamento vascular. A avaliação dos registros de ERG mostrou diminuição da amplitude de onda “b” nas respostas de bastonetes e máxima resposta entre os momentos. Conclui-se que a LV promove alterações no fundo de olhos de cães antes mesmo da ocorrência de perda visual e a miltefosina é eficaz no tratamento da doença, porém promovendo poucas mudanças dos achados de fundoscopia e de ERG.

Palavras-chave: antiprotozoário, eletrorretinografia, fundo de olho, leishmaniose visceral

2.1 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 (DANTAS-TORRES et al., 2006)

No Brasil, o agente etiológico é a *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*), transmitida pela picada de flebotomíneos, sendo a *Lutzomyia longipalpis* abundantemente encontrada em diversas áreas. O cão exerce importância epidemiológica em áreas endêmicas em razão de ser o reservatório doméstico da *Leishmania infantum* (BRASIL, 2006).

Os sintomas da doença nos cães são bem variados, gerando manifestações sistêmicas como apatia, perda de peso, linfadenomegalia; assim como alterações dermatológicas, renais e oftálmicas. A prevalência de lesões dermatológicas varia entre 56% e 90% (GREENE, 2006), enquanto as manifestações oculares ocorrem em 16 a 80% dos cães afetados, incluindo blefarites, ceratoconjuntivites e uveíte anterior como sinais mais frequentes (Di PIETRO et al., 2016). Por muitas vezes, os sintomas oftálmicos representam a primeira alteração visualizada (FULGÊNCIO, 2006; PEÑA et al., 2000; ROZE, 1986).

As lesões oculares ocasionadas pela leishmaniose canina podem afetar todas as estruturas, com predisposição pelo segmento anterior e anexos (NARANJO et al., 2005). Raramente são descritas e investigadas no segmento posterior, restritas a alguns casos de uveíte posterior, coriorretinites, e descolamento de retina (PEÑA et al., 2000; ROZE, 1986).

Essas lesões são normalmente decorrentes da presença do parasito e consequente infiltração leucocitária, ou como resultado de um processo imunomediado com depósito de imunocomplexos (GARCIA-ALONSO et al., 1996; Di PIETRO et al., 2016). A inflamação da coroide pode resultar em exsudação de fluido e células no espaço sub-retiniano, com descolamento seroso de retina, resultando em coriorretinite (VAN DER WOERDT, 2001). A hemorragia pode estar presente em coriorretinites ativas (BALICKI et al., 2013, VAN DER WOERDT, 2001). Durante o processo inflamatório, a permeabilidade capilar é aumentada, permitindo que células e proteínas possam migrar para o humor aquoso e vítreo (ORIÁ et al., 2004). A coriorretinite inativa é uma área claramente distinta, com hiperrefletividade onde, por muitas vezes, há o acúmulo de pigmento preto no centro, sendo uma lesão provável de cicatriz resultante da coriorretinite focal anterior. Esse acúmulo de pigmento é causado pela proliferação do epitélio pigmentar da retina, enquanto a hiperrefletividade é oriunda da atrofia retiniana (BALICKI et al., 2013; ORIÁ et al., 2004).

Uma avaliação oftalmológica minuciosa do segmento posterior não compreende somente uma avaliação macroscópica da retina e coroide pela oftalmoscopia, mas também, pela análise da função elétrica do tecido retiniano pela eletrorretinografia de campo total (ERG). É um exame de grande valor diagnóstico por ser objetivo, não invasivo e capaz de avaliar a resposta da túnica nervosa, permitindo detectar precocemente lesões em suas camadas mais externas (SAFATLE et al., 2010).

A miltefosina é um alquifosfolípideo relativamente seguro e altamente eficaz, sendo um fármaco tóxico para o parasita *Leishmania* e ainda mostra efeitos imunoestimuladores nos pacientes, pois melhora as células T e ativa macrófagos e produção de microbicidas (MANNA et al., 2008).

Assim, essa pesquisa buscou avaliar e descrever as principais alterações clínicas e eletrorretinográficas observadas no segmento posterior de olhos de cães com leishmaniose visceral, antes e após o tratamento com

miltefosina, já que não existem relatos científicos no Brasil de tais achados e pelas diversas limitações existentes na avaliação desse segmento, uma vez que opacidades do segmento anterior, impedem a avaliação fundoscópica.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Animais

Foram avaliados oito cães encaminhados a uma clínica veterinária situada no município de Andradina, São Paulo, Brasil, área endêmica para LV canina. Os animais eram domiciliados, machos e fêmeas, de diferentes raças e idades, com pesos variando entre 4,2 a 8,5kg. Todos os tutores assinaram, espontaneamente, um termo de consentimento livre e esclarecido, permitindo a utilização de seu animal no estudo. Em relação aos aspectos éticos, o presente trabalho obteve aprovação pelo Comitê de Ética Animal com o número de processo 569/2017 – ARAC/FO.

2.2.2 Diagnóstico e exames complementares

Os animais foram submetidos à punção biópsia aspirativa de linfonodo e/ou medula óssea, avaliados pela coloração Panótico rápido, como método parasitológico confirmatório.

Todos os pacientes foram submetidos a exames físico geral, oftálmico e complementares. Foram utilizados, como critérios de exclusão do estudo, os animais que apresentavam doenças concomitantes como Erliquiose, diagnosticada por teste imunocromatográfico (SNAP 4DX Plus Test, Idexx®, Brasil) e hipertensão arterial sistêmica não invasiva, obtida através da média de cinco aferições pelo aparelho Deltamap DL 1100 (Delta Life®). Além disso,

todos os pacientes precisavam ter transparência dos meios oculares, permitindo a avaliação e documentação fotográfica do fundo de olho. Os oito cães selecionados foram retirados de uma amostra de vinte e cinco cães avaliados com diagnóstico de LV.

Foram coletadas amostras sanguíneas para a dosagem de proteína plasmática total (PPT) nos dois momentos, visando monitorar a hiperproteinemia frente à doença.

2.2.3 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR)

Imediatamente após a realização do exame físico geral, foi realizada a colheita de material da conjuntiva de ambos os olhos, por esfregaço com suabe estéril embebido em solução fisiológica aplicado no saco conjuntival por movimentos de rotação, a fim de se coletarem, por esfoliação, células do epitélio superficial da conjuntiva, para a realização da técnica de qPCR. As amostras foram acondicionadas em microtubos do tipo Eppendorf de coloração âmbar, livres de DNase e RNase e armazenadas sob congelamento a -20 °C, até o momento da extração do DNA para realização do exame molecular.

Os olhos foram previamente dessensibilizados com colírio anestésico à base de proximetacaína 5mg/ml (Anestalcon®, Alcon, Brasil), minutos antes da colheita.

A metodologia do exame foi realizada como descrito por Benassi (2015), utilizando a sonda TaqMan® e o kit Light Cycler® 480 Probes Master (Roche®, Life Science, Brasil).

2.2.4 Exame oftálmico e eletrorretinografia (ERG)

O exame oftálmico de rotina foi realizado em ambos os olhos, sendo avaliados os seguintes parâmetros: teste da lágrima schirmer I; teste de tingimento pela fluoresceína; tonometria de aplanção e oftalmoscopia direta para avaliação fundoscópica, após dilatação pupilar obtida com colírio à base

de tropicamida 1% (Mydriacyl®, Alcon, Brasil). Com tal procedimento, realizou-se o registro das imagens com a câmera ClearView Optical®, para avaliação dos achados patológicos na retina e coróide, bem como a sua documentação fotográfica.

Após exame oftálmico ambulatorial, os cães foram submetidos à avaliação do funcionamento retiniano por eletrorretinografia com aparelho BPM-200 Electrodiagnostic System® (Retino Graphics, Inc., USA). O exame foi realizado sob sedação com cloridrato de metadona (Mytedom®, Cristália, Brasil) na dose de 0,3 mg/kg, por via intramuscular, e os pacientes foram conduzidos individualmente a uma sala escura para adaptação ao ambiente escuro, durante vinte minutos. Com o intuito de se obter cicloplegia, instilou-se, por três vezes, colírio de tropicamida 1% (Mydriacyl®, Alcon, Brasil), em ambos os olhos, com intervalo de 10 minutos entre as aplicações. Assim que o animal encontrava-se sob sedação e após adaptação ao ambiente escuro, foi realizada a anestesia tópica com colírio à base de cloridrato de proximetacaína (Anestalcon®, Alcon, Brasil) para a colocação da lente de contato própria para a realização do procedimento.

Obtiveram-se os registros com o eletrodo monopolar ERG-jet que foi posicionado sobre a córnea, após preenchê-la com solução de metilcelulose 2% (Ophthalmos®, Brasil) a fim de oferecer adesão à córnea, bem como de protegê-la. O eletrodo terra foi acoplado sobre a região do zigomático a 3,0 cm caudal ao canto lateral, e o eletrodo referência na região dorsal cervical. Durante todo o procedimento, o animal foi mantido em decúbito esternal. O programa computacional *RetinoGraphics*® comandou o número de apresentações e a duração dos estímulos luminosos, sendo utilizado o protocolo da “Internacional Society for Clinical Electrophysiology of Vision” (ISCEV) (McCULLOSH et al., 2015). Inicialmente, registraram-se as respostas de bastonetes (escotópicas), seguidas das respostas máximas (escotópicas) e após adaptação ao claro por 10 minutos, as resposta de cones (fotópicas). Em cada uma das respostas, foram feitas 16 apresentações dos estímulos luminosos, sendo considerada a resposta final, a média delas. Ao término do

mesmo, mensuraram-se as amplitudes das respostas do pico da onda “a” ao pico da onda “b”, em microvolts (μV) e o tempo de culminação da onda “b”, em milissegundos (ms), em todas as respostas. A duração do exame foi de aproximadamente 50 minutos.

2.2.5. Tratamento

O tratamento consistiu na administração, por via oral, de miltefosina (Milteforan®, Virbac, Brasil), na dose 2mg/kg, por via oral, associado ao alopurinol, na dose 10 mg/kg, diariamente por 28 dias.

As avaliações completas, como também os exames complementares, foram realizados em dois momentos, sendo M1 antes do início do tratamento e M2 imediatamente após o tratamento, com 30 dias.

2.2.6 Análise Estatística

As análises estatísticas das variáveis numéricas, medidas pela eletrorretinografia (bastonetes, máxima resposta e cones) e proteína plasmática total, foram realizadas pelo programa SAS 2001 (*Statistical Analysis System*). As variáveis foram submetidas ao teste de normalidade através do PROC Guide Data Analysis do SAS e as médias das variáveis que apresentaram distribuição normal, foram comparadas pelo teste T de Student pareado, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As variáveis categóricas avaliadas pela fundoscopia e achados clínicos oftálmicos, nos dois momentos, foram analisadas de forma descritiva e utilizando o intervalo de confiança (IC) de 95%. Os resultados foram obtidos do *OpenEpi*, Versão 3, calculadora de código aberto - *Proportion* (disponível em <http://openepi.com/Proportion/Proportion.htm>). Já os dados obtidos pelo qPCR foram avaliadas pelo teste Qi quadrado, considerando o mesmo nível de significância ($p < 0,05$).

2.3 Resultados

Dos oito animais avaliados, três eram machos (37,5%) e cinco fêmeas (62,5%), com idades variando entre um a cinco anos. A maioria dos cães (6/8) não tinha raça definida (SRD), sendo apenas dois animais de raça pura (Poodle e Lhasa Apso). Todos os animais eram de porte pequeno, com média de peso de 6 kg.

Excetuando as oftalmopatias, os achados clínicos mais encontrados foram dermatopatias, onicogribose e linfadenomegalia.

Dentre os achados clínicos, quanto aos anexos oculares e segmento anterior, dos pacientes em M1, foram encontrados: hiperemia conjuntival (75%), blefarite (62,5%), secreção ocular (37,5%), ceratoconjuntivite seca (37,5%), distrofia corneal (37,5%), lacrimejamento (25%), melanose corneal (25%), blefarospasmo (12,5%), protrusão da glândula da terceira pálpebra (12,5%) e granulação corneal (12,5%). Após o tratamento proposto (M2), os pacientes foram reavaliados, tendo seus achados oculares e suas porcentagens expressos na Tabela 1.

Quanto aos achados da avaliação fundoscópica, observam-se: hiperrefletividade (10/16), tortuosidade vascular (8/16), atenuação vascular (7/16), hiperpigmentação peripapilar (5/16), embainhamento vascular (3/16), turbidez vítrea (2/16), pigmentação retiniana (1/16), hemorragia sub-retiniana (1/16), atrofia do disco ótico (1/16) e papiledema (1/16). Após o tratamento proposto (M2), os pacientes foram reavaliados, tendo seus achados fundoscópicos e suas porcentagens expressos na Tabela 2.

Todos os animais se beneficiaram clinicamente do tratamento medicamentoso, onde 37,5% apresentaram remissão total dos sinais clínicos oftálmicos e 62,5% remissão parcial (Figuras 1 e 2). Entretanto, frente aos achados fundoscópicos, não foram mais encontradas hemorragia sub-retiniana e turbidez vítrea após tratamento, e somente um animal permanecia com

embainhamento vascular. Os outros achados permaneceram após o tratamento (Figuras 3 e 4).

A interpretação da ERG é realizada levando-se em consideração a espécie, raça e idade do animal, além da opacidade de meios, do tipo de eletrodo, do eletrorretinógrafo e do protocolo de sedação (MENTZER, 2005). Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência para seu equipamento (MCCULLOCH et al., 2015). Como os animais do estudo não apresentavam raças semelhantes, padronizou-se considerá-los controle deles mesmos, avaliando a resposta frente ao tratamento.

A avaliação dos registros de ERG mostrou diminuição da amplitude de onda “b”, quando se compararam as médias das respostas de bastonetes ($p=0,0079$) e máxima resposta ($p<0,0001$) entre os momentos. Com relação ao tempo de culminação da onda “b”, não foram encontrados resultados estatisticamente significantes entre os momentos, da mesma forma quando comparados entre os olhos direito e esquerdo ($p>0,05$) (Tabela 3). Os valores das respostas eletrorretinográficas nos dois momentos para cada animal do estudo, estão descritos na Tabela 4.

Apenas um animal do estudo apresentou alterações drásticas das respostas eletrorretinográficas após o tratamento (M2), com uma significativa diminuição na resposta de bastonetes do OS e da máxima resposta do OD, e evolução para ausência de onda (*flat line*) na máxima resposta e na resposta de cones do OS, caracterizando uma atrofia progressiva de retina no OS (Figura 5).

No exame de qPCR, seis cães foram positivos em M1, e dois negativos. Em M2, quatro animais negativaram após o tratamento; os dois animais negativos em M1, mantiveram-se e dois pacientes infectados em M1, permaneceram positivos em M2, demonstrando a permanência de parasito no tecido ocular (Tabela 5). Houve melhora estatisticamente significativa frente ao tratamento, quando comparados entre os momentos ($p=0.0047$).

Com relação aos níveis séricos de PPT, 87,5% dos cães apresentavam hiperproteinemia antes do tratamento (M1). Após o tratamento (M2), 62,5% dos cães se mantiveram com a PPT elevada, e 37,5% deles tiveram redução dos valores à normalidade. A análise estatística deste parâmetro, entre os momentos, não foi significativa ($p=0,2680$).

Tabela 1 - Porcentagem e intervalo de confiança (IC) dos achados clínicos oculares encontrados nos cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, antes (M1) e imediatamente após o tratamento de 28 dias com miltefosina e alopurinol (M2)

Achados Clínicos	Momento 1				Momento 2		
	Sim %	IC	Não (%)	IC	Sim (%)	IC	Não (%)
	(n° absoluto/total)	95%	(n° absoluto/total)	95%	(n° absoluto/total)	95%	(n° absoluto/total)
Lacrimejamento	25,00 (2/8)	7,15; 59,07	75,00 (6/8)	40,93; 92,85	0 (0/8)	0,0; 32,44	100,00 (8/8)
Secreção Ocular	37,50 (3/8)	13,69; 69,42	62,50 (5/8)	30,58; 86,31	0 (0/8)	0,0; 32,44	100,00 (8/8)
Hiperemia Conjuntival	75,00 (6/8)	40,93; 92,85	25,00 (2/8)	7,15; 59,07	25,00 (2/8)	7,15; 59,07	75,00 (6/8)
Blefarospasmo	12,50 (1/8)	2,24; 47,09	87,50 (7/8)	52,91; 97,76	0 (0/8)	0,0; 32,44	100,00 (8/8)
Blefarite	62,50 (5/8)	30,58; 86,31	37,50 (3/8)	13,69; 69,42	25,00 (2/8)	7,15; 59,07	75,00 (6/8)
Melanose Corneal	25,00 (2/8)	7,15; 59,07	75,00 (6/8)	40,93; 92,85	25,00 (2/8)	7,15; 59,07	75,00 (6/8)
Protrusão da Glândula da 3ª Pálpebra	12,50 (1/8)	2,24; 47,09	87,50 (7/8)	52,91; 97,76	12,50 (1/8)	2,24; 47,09	87,50 (7/8)
Distrofia Corneal	37,50 (3/8)	13,69; 69,42	62,50 (5/8)	30,58; 86,31	37,50 (3/8)	13,69; 69,42	62,50 (5/8)
Granulação Corneal	12,50 (1/8)	2,24; 47,09	87,50 (7/8)	52,91; 97,76	0 (0/8)	0,0; 32,44	100,00 (8/8)
Ceratoconjuntivite Seca	37,50 (3/8)	13,69; 69,42	62,50 (5/8)	30,58; 86,31	0 (0/8)	0,0; 32,44	100,00 (8/8)

Tabela 2– Porcentagem e intervalo de confiança (IC) dos achados fundoscópicos oculares encontrados nos cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, antes (M1) e imediatamente após o tratamento de 28 dias com miltefosina e alopurinol (M2)

Achados Fundoscópicos	Momento 1				Momento 2		
	Sim %	IC	Não (%)	IC	Sim (%)	IC	Não (%)
	(n° absoluto/total)	95%	(n° absoluto/total)	95%	(n° absoluto/total)	95%	(n° absoluto/total)
Atenuação Vascular	43,75 (7/16)	23,10; 66,82	56,25 (9/16)	33,18; 76,90	43,75 (7/16)	23,10; 66,82	56,25 (9/16)
Hiperrefletividade	62,50 (10/16)	38,64; 81,52	37,50 (6/16)	18,48; 61,36	62,50 (10/16)	38,64; 81,52	37,50 (6/16)
Pigmentação de Retina	6,25 (1/16)	11,11; 28,33	93,75 (15/16)	71,67; 98,89	6,25 (1/16)	11,11; 28,33	93,75 (15/16)
Embainhamento Vascular	18,75 (3/16)	6,59; 43,01	81,25 (13/16)	56,99; 93,41	6,25 (1/16)	11,11; 28,33	93,75 (15/16)
Hiperpigmentação Peripapilar	31,25 (5/16)	14,17; 55,59	68,75 (11/16)	44,41; 85,83	31,25 (5/16)	14,17; 55,59	68,75 (11/16)
Hemorragia Sub-retiniana	6,25 (1/16)	11,11; 28,33	93,75 (15/16)	71,67; 98,89	0 (0/16)	0,0; 19,36	100,00 (16/16)
Atrofia de Disco Ótico	6,25 (1/16)	11,11; 28,33	93,75 (15/16)	71,67; 98,89	6,25 (1/16)	11,11; 28,33	93,75 (15/16)
Turbidez Vítrea	18,75 (3/16)	6,59; 43,01	81,25 (13/16)	56,99; 93,41	0 (0/16)	0,0; 19,36	100,00 (16/16)
Papiledema	6,25 (1/16)	11,11; 28,33	93,75 (15/16)	71,67; 98,89	6,25 (1/16)	11,11; 28,33	93,75 (15/16)
Tortuosidade Vascular	50,00 (8/16)	28,00; 72,00	50,00 (8/16)	28,00; 72,00	50,00 (8/16)	28,00; 72,00	50,00 (8/16)

Tabela 3 – Avaliação das respostas eletrorretinográficas por análise de média e desvio padrão encontradas nos olhos dos cães acometidos por leishmaniose visceral antes do tratamento (M1) e imediatamente após o término do tratamento por 28 dias com miltefosina e alopurinol (M2)

Respostas	Momento 1	Momento 2
	X ± DP	X ± DP
Bast. - Amp. (µV)	253.29 ± 78.10*	185.69 ± 53.98*
Bast. - TC (ms)	34.26 ± 7.20	37.94 ± 9.25
Máx. - Amp. (µV)	159.94 ± 38.63*	88.59 ± 36.89*
Máx. - TC (ms)	57.58 ± 5.95	54.14 ± 15.64
Cones - Amp. (µV)	73.64 ± 42.52	75.64 ± 36.87
Cones - TC (ms)	27.42 ± 8.03	28.03 ± 8.27

µV = microvolts; ms = milisegundos; Bast = bastonetes, Máx = máximas; Amp = amplitude; TC= tempo de culminação.

* Diferença significativa entre os momentos (p<0,05)

Tabela 4 – Amplitude (μV) e tempo de culminação (ms) das respostas de bastonetes, máximas respostas e respostas de cones obtidas de cães acometidos por leishmaniose visceral antes do tratamento (M1) e imediatamente após o término do tratamento por 28 dias com miltefosina e alopurinol (M2)

Animais	Momentos	Respostas					
		Bast. - Amp. (μV)	Bast. - TC (ms)	Máx. - Amp. (μV)	Máx. - TC (ms)	Cones - Amp. (μV)	Cones - TC (ms)
1	M1	388.61 \pm 3.14 *	30.5 \pm 0.35	199.45 \pm 39.48	61,75 \pm 6.36	43.61 \pm 38.89	36.50 \pm 9.54
	M2	97.71 \pm 77.48 *	51.50 \pm 18.74	44.98 \pm 63.61	30.37 \pm 42.96	35.55 \pm 50.28	14.87 \pm 21.04
2	M1	324.79 \pm 5.6 *	32.00 \pm 10.96	166.39 \pm 12.77 *	55.00 \pm 2.47	49.16 \pm 46.94	19.00 \pm 8.84
	M2	195.69 \pm 18.66 *	30.75 \pm 2.12	115.76 \pm 8.74 *	53.37 \pm 1.24	82.77 \pm 2.55	25.50 \pm 0.35
3	M1	169.86 \pm 21.01	32.13 \pm 1.59	161.66 \pm 14.53	60.25 \pm 1.77	25.83 \pm 7.07	26,75 \pm 17.68
	M2	172.15 \pm 17.38	33.50 \pm 0	91.53 \pm 42.43	54.63 \pm 0.88	55.14 \pm 19.64	27.13 \pm 0.53
4	M1	262.63 \pm 68.16	48.87 \pm 8.66	167.91 \pm 27.73	66.87 \pm 4.06	107.77 \pm 46.75	32.12 \pm 3.0
	M2	186.46 \pm 14.44	32.62 \pm 3.71	117.08 \pm 40.27	53.89 \pm 6.57	87.79 \pm 9.60	30.37 \pm 2.65
5	M1	242.50 \pm 25.14	31.50 \pm 2.47	172.78 \pm 16.30 *	53.12 \pm 1.24	125.97 \pm 17.87	27.37 \pm 2.30
	M2	198.95 \pm 34.47	36.25 \pm 0.35	105.97 \pm 2.16 *	59.25 \pm 9.19	116.87 \pm 23.67	30.75 \pm 1.06
6	M1	251.04 \pm 48.41	32.12 \pm 3.00	131.04 \pm 3.04 *	58.12 \pm 6.54	116.81 \pm 0	28.25 \pm 0
	M2	271.11 \pm 45.76	39.50 \pm 6.72	113.61 \pm 0.78 *	54.75 \pm 1.77	122.29 \pm 37.42	30.00 \pm 2.47
7	M1	164.36 \pm 64.30	36.62 \pm 4.77	152.29 \pm 91.62	56.25 \pm 1.77	57.29 \pm 20.53	22.12 \pm 7.60
	M2	201.74 \pm 26.42	37.37 \pm 2.30	60.76 \pm 4.22	65.87 \pm 4.77	47.50 \pm 22.19	36.50 \pm 5.30
8	M1	222.50 \pm 18.85	30.37 \pm 0.88	127.99 \pm 60.20	49.25 \pm 0	62.71 \pm 23.47	27.25 \pm 1.77
	M2	161.73 \pm 14.43	42.00 \pm 15.91	59.03 \pm 27.89	61.00 \pm 10.61	57.22 \pm 21.41	29.12 \pm 0.18

μV = microvolts; ms = milisegundos; Bast = bastonetes, Máx = máximas; Amp = amplitude; TC= tempo de culminação. * Diferença significativa entre os momentos ($p < 0,05$)

Tabela 5 - Resultados do exame de reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) do tecido conjuntival e dosagem de proteína plasmática total (PPT) de cães acometidos naturalmente por leishmaniose visceral antes (M1) e imediatamente após o término de 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol (M2)

ANIMAIS	Momento 1		Momento 2	
	qPCR	PPT	qPCR	PPT
1	POSITIVO	10,2	POSITIVO	8,4
2	POSITIVO	8,7	NEGATIVO	8,0
3	NEGATIVO	10,3	NEGATIVO	8,4
4	POSITIVO	9,2	NEGATIVO	9,9
5	POSITIVO	11,4	NEGATIVO	11,6
6	NEGATIVO	6,7	NEGATIVO	5,7
7	POSITIVO	10,0	POSITIVO	10,6
8	POSITIVO	8,8	NEGATIVO	7,6

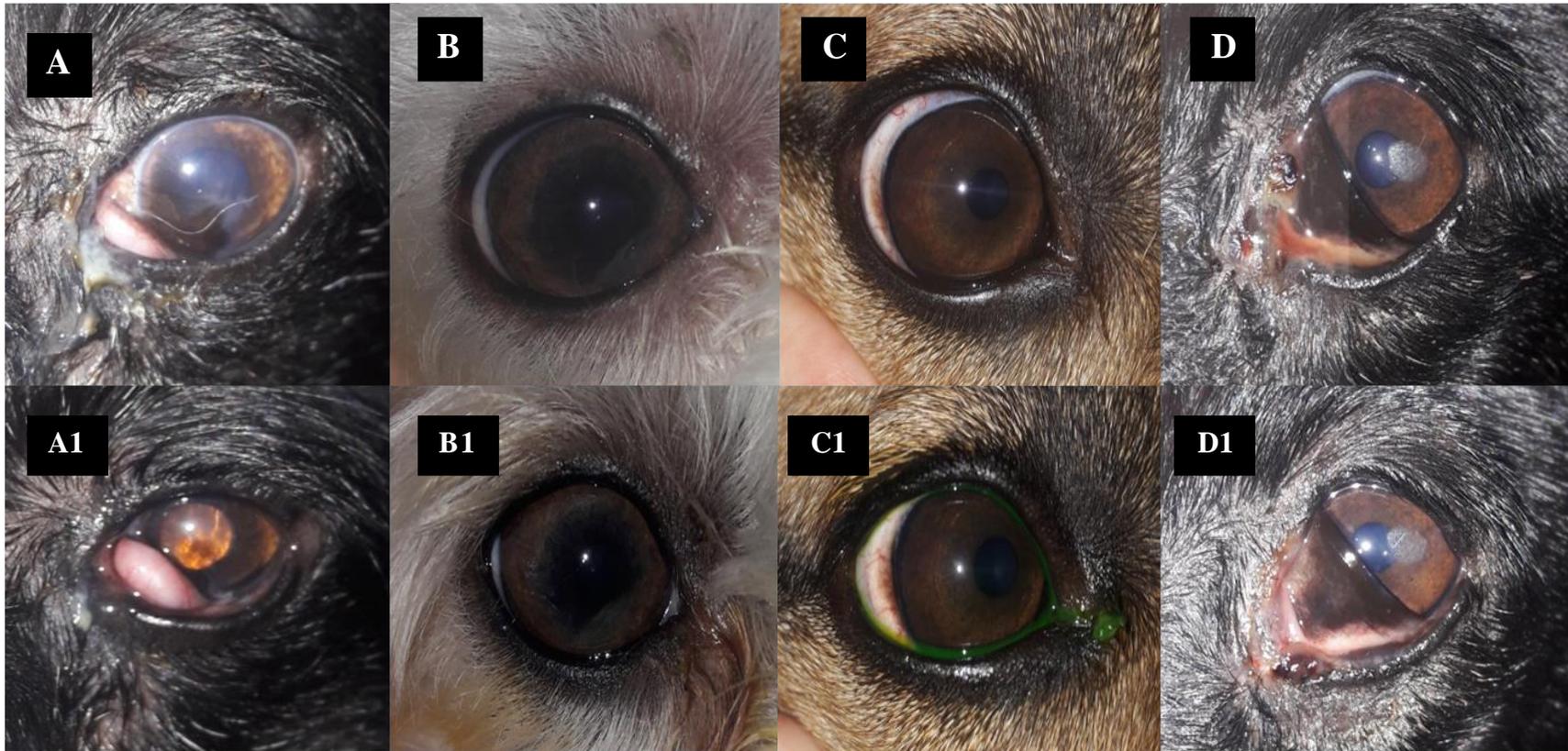


Figura 1 – Achados clínicos oculares de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral antes do tratamento (M1) e imediatamente após o término do tratamento por 28 dias com miltefosina e alopurinol (M2). Paciente 1: A. Olho esquerdo em M1, apresentando secreção ocular, hiperemia conjuntival, protrusão da glândula da terceira pálpebra e melanose corneal. A1. Olho esquerdo em M2, apresentando hiperemia, protrusão da glândula da terceira pálpebra e melanose corneal. Paciente 2: B. Olho direito em M1, apresentando discreta hiperemia conjuntival. B1. Olho direito em M2, não apresentando sinais inflamatórios. Paciente 3: C. Olho direito em M1, apresentando discreta hiperemia conjuntival. C1. Olho direito em M2, apresentando discreta hiperemia. Paciente 4: D. Olho esquerdo em M1, apresentando hiperemia conjuntival, blefarite ulcerativa com perda de tecido palpebral, protrusão da terceira pálpebra e distrofia corneal. D1. Olho esquerdo em M2, apresentando hiperemia conjuntival, discreta blefarite ulcerativa com perda de tecido palpebral, protrusão da terceira pálpebra e distrofia corneal.

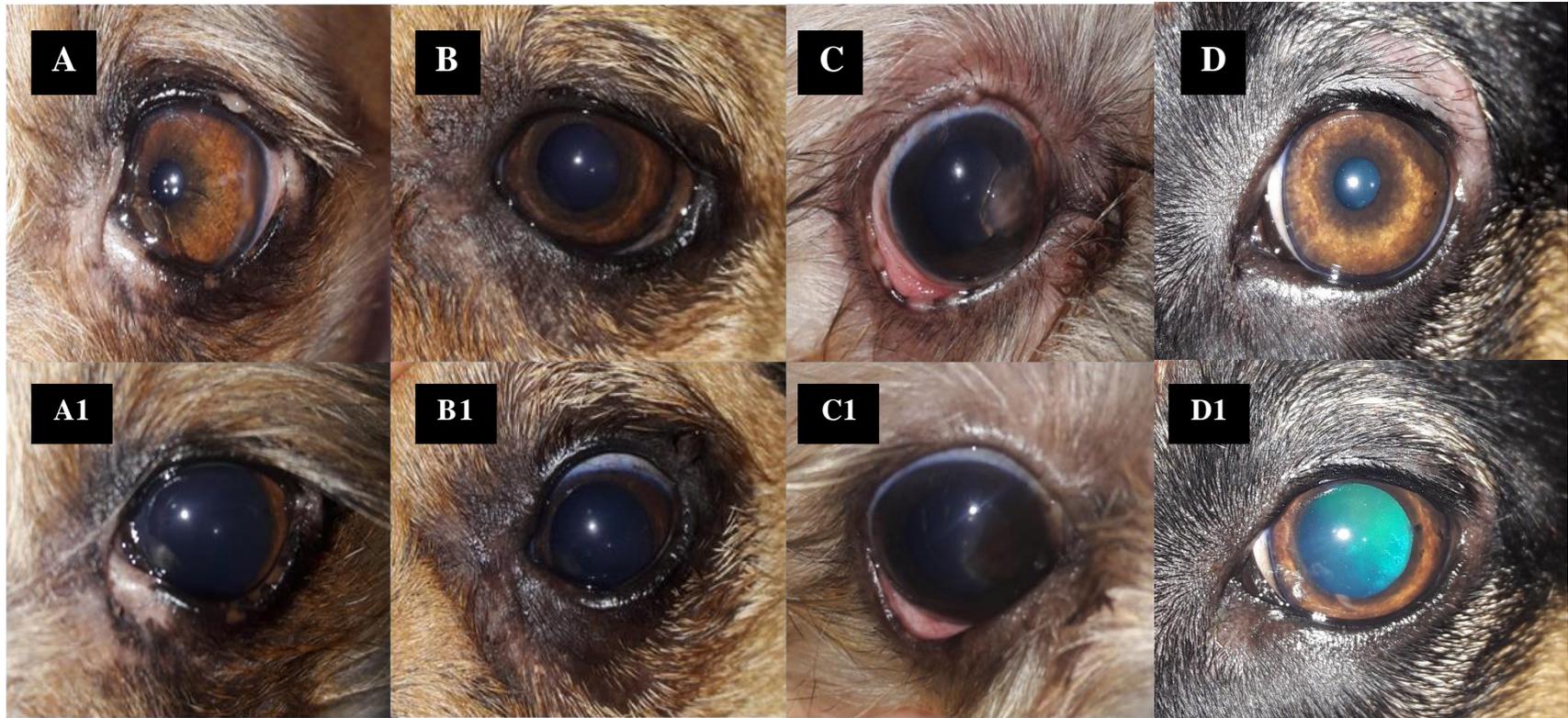


Figura 2 – Achados clínicos oculares de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral antes do tratamento (M1) e imediatamente após o término do tratamento por 28 dias com miltefosina e alopurinol (M2). Paciente 5: A. Olho esquerdo em M1, apresentando hiperemia conjuntival, blefarite e distrofia corneal. A1. Olho esquerdo em M2, apresentando discreta blefarite. Paciente 6: B. Olho esquerdo em M1, apresentando hiperemia conjuntival. B1. Olho esquerdo em M2 sem sinais inflamatórios. Paciente 7: C. Olho direito em M1, apresentando hiperemia conjuntival, blefarite, granulação e melanose corneal. C1. Olho direito em M2 apresentando melanose corneal. Paciente 8: D. Olho esquerdo em M1, apresentando alopecia periocular em canto temporal. D1. Olho esquerdo em M2 sem sinais inflamatórios ou dermatológicos.

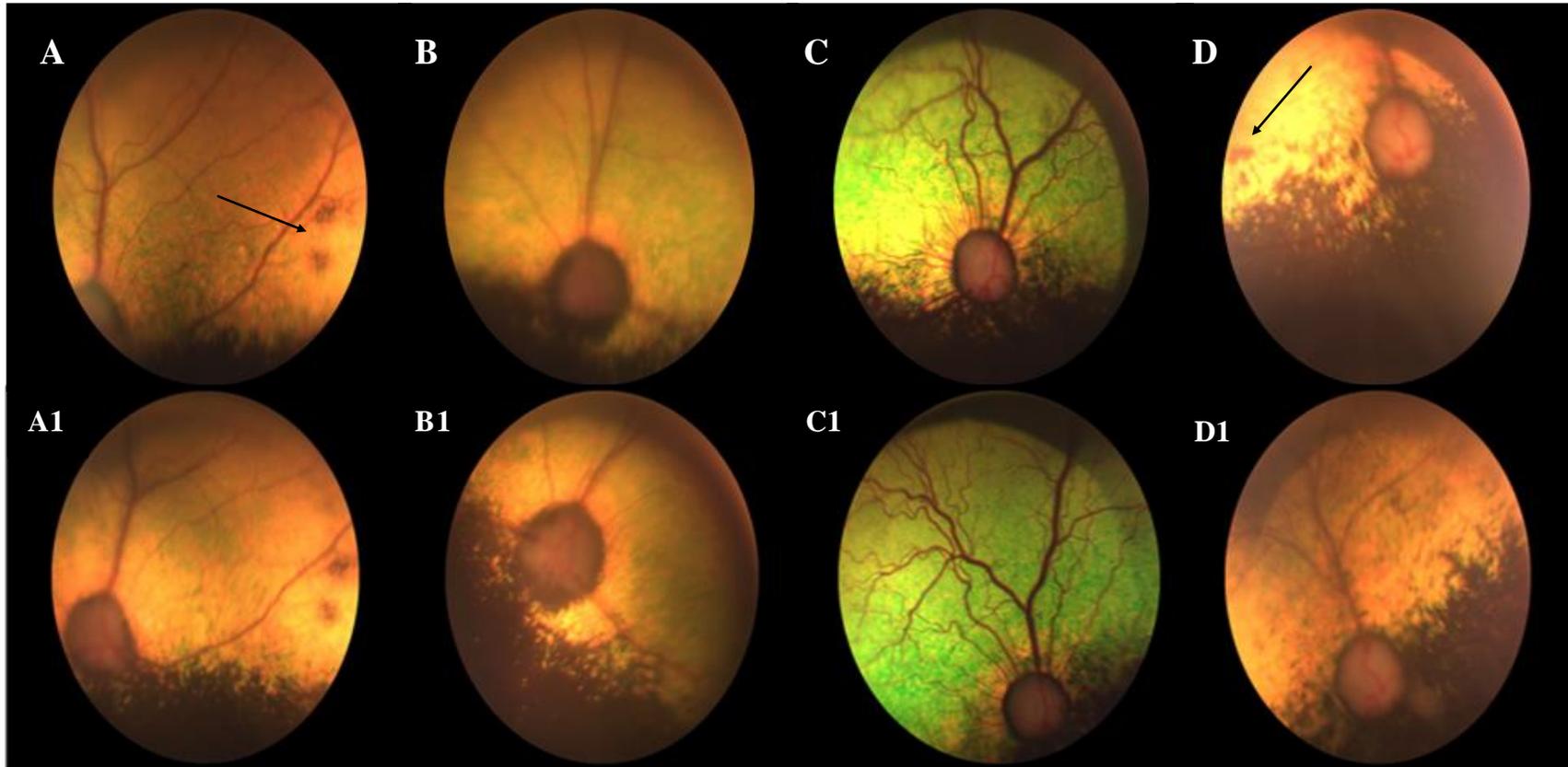


Figura 3 - Achados de fundoscopia de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral antes do tratamento (M1) e imediatamente após o término do tratamento por 28 dias com miltefosina e alopurinol (M2). A. Hiperrefletividade, atenuação vascular e pigmentação da retina (seta) em M1. A1. Hiperrefletividade, atenuação vascular e pigmentação da retina em M2. B. Turbidez vítrea, hiperpigmentação peripapilar com atrofia do disco óptico e atenuação vascular em M1. B1. Hiperpigmentação peripapilar com atrofia do disco óptico e atenuação vascular em M2. C. Papiledema e tortuosidade vascular em M1. C1. Papiledema e tortuosidade vascular em M2. D Atenuação vascular, hiperpigmentação peripapilar, hiperrefletividade e hemorragia sub-retiniana (seta) em M1. D1 Atenuação vascular, hiperpigmentação peripapilar e hiperrefletividade em M2

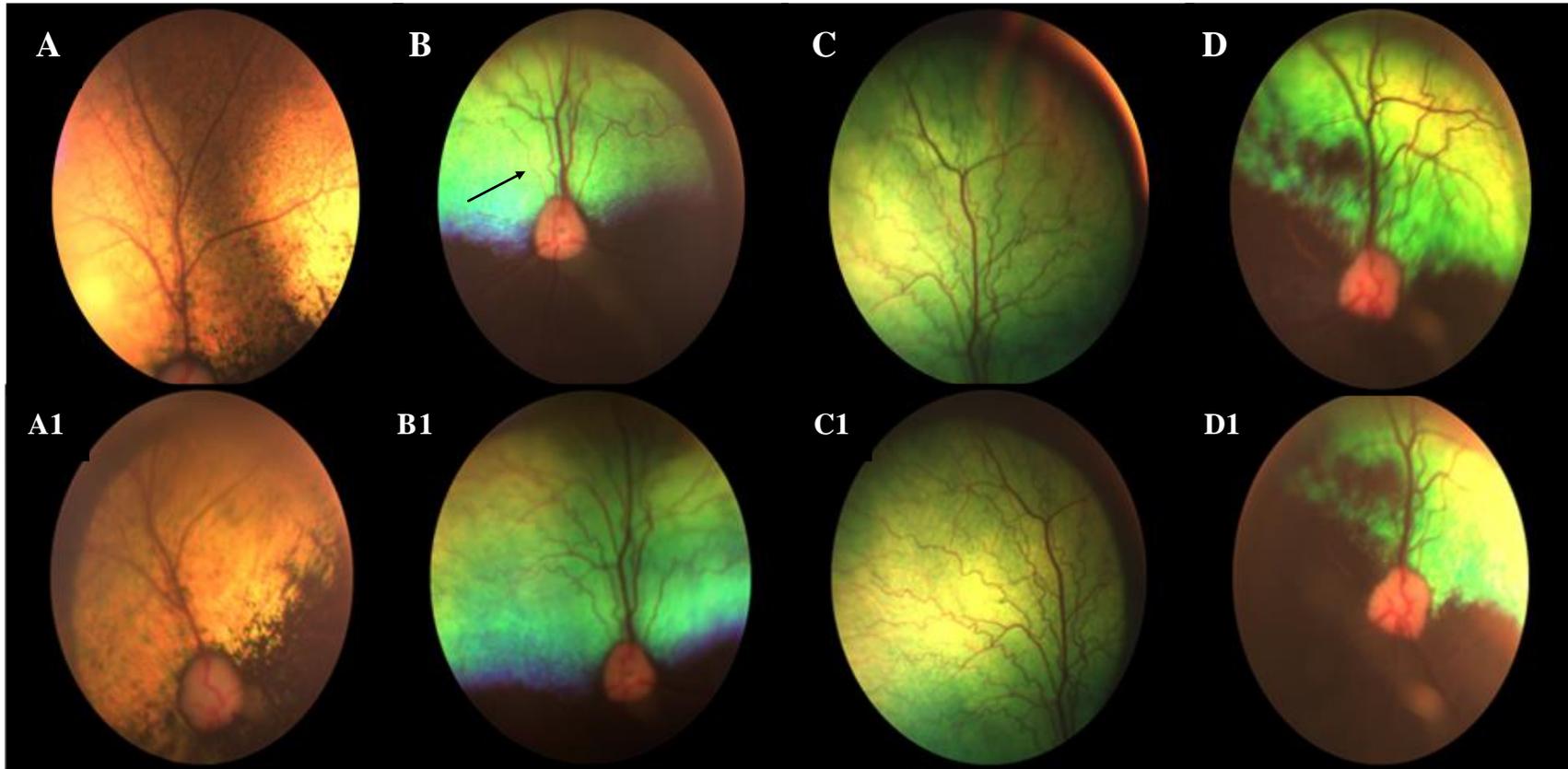


Figura 4 - Achados de fundoscopia de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral antes do tratamento (M1) e imediatamente após o término do tratamento por 28 dias com miltefosina e alopurinol (M2). A. Atenuação vascular e hiperrefletividade em M1. A1. Atenuação vascular e hiperrefletividade em M2. B. Embainhamento vascular (seta) e tortuosidade vascular em M1. C. Tortuosidade vascular e hiperrefletividade em M1. C1. Tortuosidade vascular e hiperrefletividade em M2. D. Tortuosidade vascular em M1. D1. Tortuosidade vascular em M2.

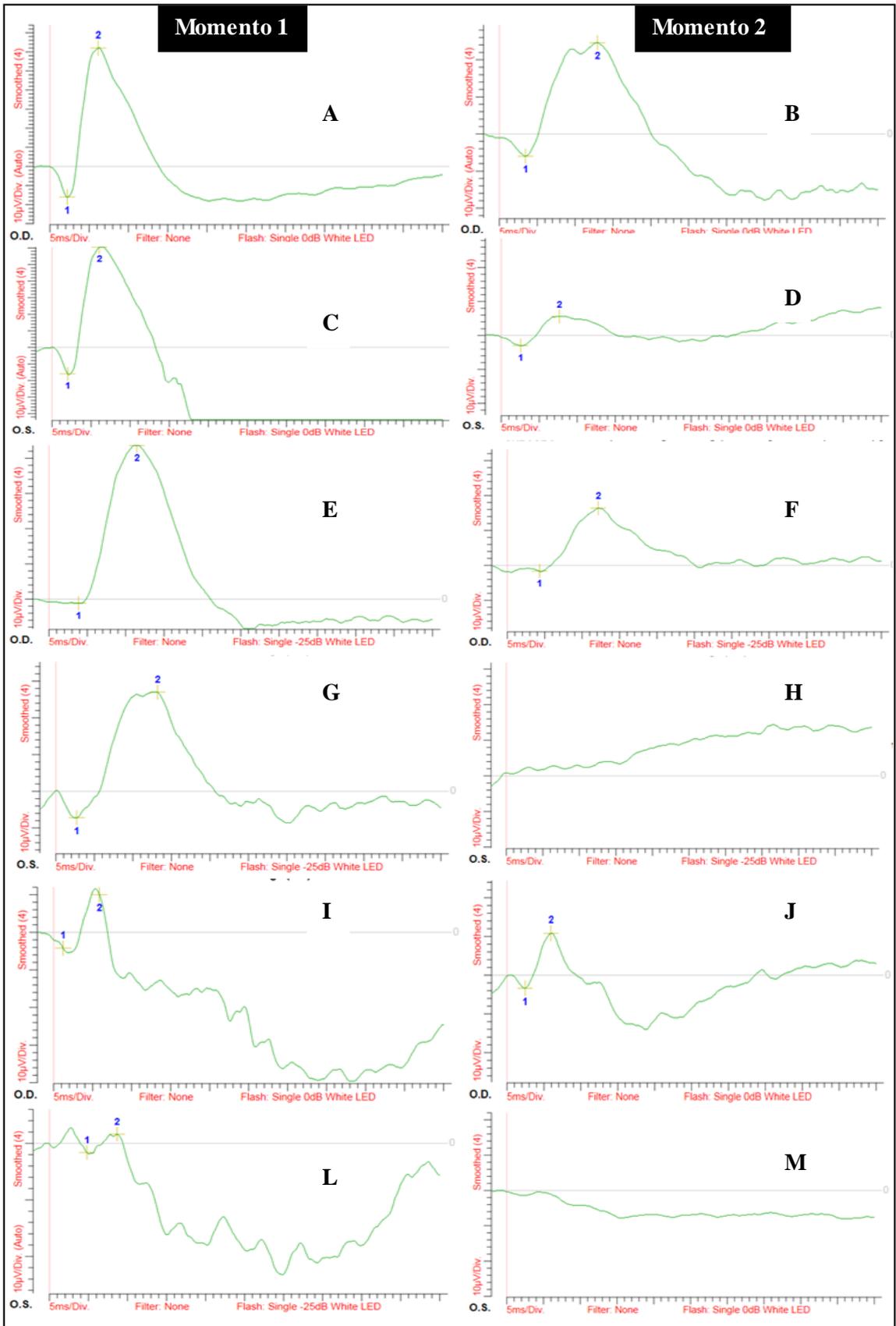


Figura 5 – Representação dos traçados eletrorretinográficos dos olhos direito (OD) e esquerdo (OS) do animal #1 acometido por leishmaniose visceral antes do tratamento (M1) e imediatamente após o término do tratamento por 28 dias com miltefosina e alopurinol (M2). A- Resposta de Bastonetes OD em M1, B- Resposta de Bastonetes OD em M2, C- Resposta de Bastonetes OS em M1, D- Resposta de Bastonetes OS em M2, E – Máxima Resposta OD em M1, F – Máxima Resposta OD em M2, G - Máxima Resposta OS em M1, H – Máxima Resposta OS em M2, I – Resposta de Cones OD em M1, J – Resposta de Cones OD em M2, L - Resposta de Cones OS em M1, M - Resposta de Cones OS em M2. Observar uma diminuição drástica na Resposta de Bastonetes do OS em M2 e da Máxima Resposta do OD M2. “Flat line” foram encontradas na Máxima Resposta do OS em M2 e na Resposta de Cones do OS em M2.

2.4 Discussão

A leishmaniose visceral (LV) canina promove um quadro sintomático variado e, na maioria dos casos, há manifestações dermatológicas e oftalmológicas que quase sempre são as primeiras a aparecerem nos animais acometidos. As lesões oculares podem afetar todas suas estruturas, tendo uma predileção pelo segmento anterior e anexos (NARANJO et al., 2005; BRITO et al. 2006; BRITO et al., 2010), o que foi visto em grande parte dos animais desse estudo sendo, portanto, uma limitação para avaliação das estruturas do segmento posterior. Dessa forma, a seleção de pacientes aqui estudados tornou-se mais complexa, justificando um número restrito a oito animais.

As manifestações clínicas do segmento posterior são raramente descritas em cães, devido à baixa predileção do parasito pelas estruturas que o compõe e, também, pela dificuldade em se obter um exame de fundo de olho detalhado devido à opacificação dos meios transparentes de segmento anterior (GALLEGO et al., 1986; MOLLEDA et al., 1993; PEÑA et al., 2000; ROZE, 2004). Por isso, o estudo preconizou selecionar pacientes que não apresentassem opacidade dos meios transparentes significantes, visando uma avaliação mais precisa das estruturas do fundo do olho, o que permitiu descrevê-las e documentá-las por imagens fotográficas.

O envolvimento do sistema nervoso central na LV é raramente relatada e

provavelmente desconhecida. Porém, a neuroinflamação, causando ruptura da barreira hematocular com o trânsito de células inflamatórias e formas amastigotas de *Leishmania*, tem sido sugerida como um possível mecanismo (MAUDE et al., 2014).

Poucos são os estudos que descrevem as alterações do segmento posterior encontradas em cães naturalmente infectados pelo parasito (ROZE, 1986; PEÑA et al., 2000; BRITO et al., 2010). Várias alterações macroscópicas encontradas nesse trabalho sugerem que a doença pode acometer, também, o segmento posterior de olhos de cães com LV, as quais podem redundar em complicações inflamatórias antes mesmo da ocorrência de perda visual, como descritas por Brito et al. (2010), que avaliou histologicamente olhos de cães com a doença, e descreveu que a coróide e a retina não apresentava formas amastigotas do parasito, porém encontrou-se congestão vascular. Dentre as alterações encontradas no presente estudo, destacam-se: atenuação vascular, hiperrefletividade, pigmentação retiniana, embainhamento vascular, hiperpigmentação peripapilar, hemorragia sub-retiniana, turbidez vítrea, papiledema e tortuosidade vascular, que coadunam com os relatos de Oriá et al. (2004), que estudaram uveíte em cães com erliquiose, cujo caráter imunopatogênico é similar ao da leishmaniose visceral; e com Brito et al. (2010), que sugere lesões microscópicas sugestivas de coriorretinites.

Estudos em humanos acometidos por leishmaniose visceral mostram alterações fundoscópicas que sugerem vasculopatia retiniana, com uma possível etiologia inflamatória (MAUDE et al., 2014; ARAGÃO et al., 2015). Outras lesões oculares descritas em humanos, incluem: retinite subaguda focal, enfartes da camada de fibras nervosas, trombose da veia central da retina, papilite e ceratite, todas responsivas ao tratamento medicamentoso (ARAGÃO et al., 2015). No presente estudo, foi possível a observação de melhora do quadro de vasculite após o término do tratamento.

Fulgêncio (2006), avaliando as alterações do segmento posterior dos olhos de cães acometidos por LV, sugeriu que se tratavam, provavelmente, de

um quadro de panuveíte com sinais oriundos da extensão de processos inflamatórios da úvea anterior, já que havia inflamação significativa da íris e/ou corpo ciliar em todos os animais. Não foram encontrados sinais graves de uveíte anterior e panuveíte em nosso estudo, caracterizadas por lesões restritas ao segmento posterior, cuja gênese, provavelmente, fosse por ação de infiltrado inflamatório ou mesmo por ação direta do parasita sobre a coroide ou retina. Dados que também já foram reportados (ORÍÁ et.al, 2004; PEÑA et al., 2008; BRITO et al., 2010).

A turbidez vítrea encontrada em alguns pacientes, pode estar relacionada à hiperproteinemia existente previamente ao tratamento. Isto pode justificar, durante o processo inflamatório, haver transudação proteica e diapedese para o humor vítreo devido ao aumento da permeabilidade vascular, inerente aos processos inflamatórios. Tal evento enseja nebulosidade vítrea (ORÍÁ et al., 2004; VAN DER WOERDT, 2001).

Vasculites originam-se do depósito de imunocomplexos no endotélio vascular, propiciando, quase sempre, hemorragia ocular, conjuntamente com o aumento da pressão oncótica, além da disfunção plaquetária (ORÍÁ et al., 2004). Estes achados são encontrados na inflamação ativa (VAN DER WOERDT, 2001), observados em um cão que apresentava hemorragia sub-retiniana antes do tratamento, possivelmente oriunda da coroide. Segundo Maude et al. (2014), que avaliaram as alterações na retina de humanos com leishmaniose visceral, descrevem alterações de esbranquiçamento perivascular e vasos tortuosos, sugestivos de vasculite de retina, podendo gerar uma isquemia focal. Hemorragia intra-retiniana foi descrita em um humano acometido por LV, que teve a lesão regredida completamente após tratamento após tratamento (ARAGÃO et al., 2015), semelhante ao encontrado em nosso estudo.

A elevação das proteínas plasmáticas totais (PPT) com inversão da relação albumina/globulina (hipergamaglobulinemia, e hipoalbuminemia) ocorre na maioria dos animais com doença clínica (BRIFFOD, 2011; MAGNO, 2007;

NOGUEIRA, 2007). A hipergamaglobulinemia sugere uma resposta imune exacerbada que é ineficiente, podendo causar a síndrome da hiperviscosidade sanguínea (ANDEREG; PASSOS, 1999). Estes achados hematológicos são observados, também, na erliquiose canina, onde o aumento da pressão oncótica relacionada à hiperproteinemia e à hiperviscosidade podem causar retinopatia hipertensiva e hifema (ORIÁ et al., 2004). O quadro de hiperviscosidade pode ter ocorrido nos pacientes aqui estudados que apresentavam hiperproteinemia, pois foram observados achados fundoscópicos de tortuosidade dos vasos retinianos. Os achados de tortuosidade vascular na retina são os sinais mais frequentes de alteração nessa estrutura descritos em humanos acometidos pela doença (MAUDE et al., 2014). Histologicamente, a coroide e a retina em cães com leishmaniose visceral apresentam congestão vascular, com a presença de células inflamatórias, sugerindo um quadro de coriorretinite (BRITO et al., 2010), achados condizentes com os encontrados em nosso estudo.

A coriorretinite inativa foi encontrada em nosso estudo com sinais de hiperrefletividade e áreas de acúmulo de pigmento enegrecido na retina, que pode estar relacionado a uma provável lesão cicatricial que advém de coriorretinite focal prévia. Esse acúmulo de pigmento é causado pela proliferação do epitélio pigmentar da retina, e a hiperrefletividade é oriunda da atrofia retiniana (BALICKI et al., 2013; ORIÁ et al., 2004). Tais achados foram também relatados por Peña et al. (2008) que descreveram os achados histopatológicos de atrofia progressiva da retina em cães com LV.

Em estudos com cães infectados experimentalmente com *Ehrlichia canis* (ORIÁ et al., 2004), os animais desenvolveram ingurgitamento de vasos retinianos durante a fase febril no início da doença. Esta fase foi seguida de regressão da congestão vascular, com desenvolvimento simultâneo das lesões perivasculares nas zonas tapetal e não-tapetal. As lesões reduziram em extensão, tornando-se discretas, ou eram substituídas por áreas de intensa hiperrefletividade semelhantes àsquelas observadas na atrofia progressiva da

retina (APR), mas sem a atenuação vascular típica. Acredita-se que tais achados sejam semelhantes aos encontrados na leishmaniose visceral canina, pois alguns animais apresentavam hiperrefletividade sem uma atenuação vascular característica de atrofia progressiva de retina.

Todos os animais aqui estudados apresentavam os meios oculares transparentes, o que permitiu uma avaliação mais precisa do segmento posterior. Porém, alguns pacientes apresentavam pequenas opacidades focais da córnea, como ceratite pigmentar e distrofias corneais, que poderiam ser oriundas das disfunções lacrimais e reações inflamatórias oculares, que são achados comuns na LV canina (ROZE, 2004; SAHUQUILLO, 2005).

A mensuração da amplitude de onda “b” é a mais utilizada para interpretar clinicamente os resultados do exame, onde uma baixa amplitude significa diminuição do número funcional de fotorreceptores (KOMAROMY et al., 1998). Com isso, quando avaliadas as médias entre os momentos, observou-se que os animais estudados apresentavam diminuição da amplitude de onda “b” na resposta de bastonetes e máxima resposta após o tratamento, sugerindo que os pacientes possam apresentar lesões de bastonetes decorrentes da doença e que não são reversíveis após o tratamento com a miltefosina. Com relação ao tempo de culminação da onda “b”, não foram encontrados resultados estatisticamente significantes entre os momentos em ambos fotorreceptores. Esses achados divergem de estudos anteriores de cães com coriorretinites inativas (BALICKI et al.; 2013), cujos registros da eletrorretinografia mostraram uma função prejudicada de cones, com menor amplitude da onda “b” e tempos implícitos prolongados. Apenas um animal de nosso estudo apresentou características fundoscópicas de atrofia de retina, tendo nos seus achados eletrorretinográficos a diminuição da amplitude da onda “b” de cones e menor tempo implícito, após o tratamento, quando comparado ao M1.

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; MANNA et al., 2008). Com isso, o qPCR foi escolhido para o acompanhamento da progressão da doença e resposta medicamentosa em nossos pacientes. Como a conjuntiva ocular possui um tecido linfóide pelo qual o parasito tem afinidade, o exame foi realizado com a colheita de material nesse local para torná-lo mais sensível e específico (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; STRAUSS-AYALI; BANETH, 2004).

Na avaliação em M1, em 75% (6/8) dos animais, observaram-se parasitos na conjuntiva, e apenas 25% (2/8) não apresentavam parasitos detectáveis no tecido avaliado. Em M2, foi realizada uma nova colheita que permitiu verificar a eficácia terapêutica, cujos resultados apontaram para eficácia medicamentosa, onde 75% (6/8) dos animais responderam ao tratamento, não sendo encontrados parasitos no tecido ocular. Todos que eram negativos (2/2) em M1, permaneceram após o tratamento. Os 25% (2/6) dos pacientes infectados em M1, permaneceram positivos em M2, indicando ineficácia do tratamento instituído, se considerarmos somente esse parâmetro de avaliação. Os resultados encontrados no presente trabalho frente ao tratamento com miltefosina e alopurinol, corroboram os encontrados por Manna et al. (2009), que concluíram que a redução da carga parasitária em um primeiro ciclo de tratamento é drástica e progressiva.

Comparativamente aos achados de qPCR, foram realizadas dosagens séricas de PPT, que revelaram que os 87,5% (7/8) dos pacientes apresentavam taxas elevadas antes do tratamento, em concordância com outros estudos (BRIFOD, 2011; MAGNO, 2007; NOGUEIRA, 2007). Nossos achados de tortuosidade vascular em fundoscopia podem ser justificados pela hiperviscosidade sanguínea, oriundas da hiperproteinemia.

Considera-se que a miltefosina não induz à toxicidade da retina de cães e no homem, mas pode promover degeneração de retina que, quase sempre, é dose e tempo dependentes, sendo descrito em ratos (SINDERMANN; ENGEL,

2006). Estudos clínicos realizados em humanos com LV, utilizando doses até 250mg/dia durante 28 dias, não mostraram nenhuma toxicidade a retina (SUNDAR; OLLIARO, 2007). No entanto, acredita-se que a dose e o tempo em que ela foi utilizada no presente trabalho, não foi capaz de induzir alterações macroscópicas que justificassem piora dos achados fundoscópicos após o tratamento. Porém, a diminuição da amplitude da onda “b” de bastonetes e máxima resposta, mesmo sem alteração clínica visual, pode ser considerado um achado condizente com uma toxicidade momentânea ao uso da miltefosina.

2.5 Conclusão

Em conclusão, a leishmaniose visceral pode promover várias alterações macroscópicas no segmento posterior de olhos de cães, as quais podem redundar em complicações inflamatórias antes mesmo que ocorra perda visual. Dentre elas, destacam-se atenuação vascular, hiperrefletividade, pigmentação retiniana, embainhamento vascular, hiperpigmentação peripapilar, hemorragia sub-retiniana, turbidez vítrea, papiledema e tortuosidade vascular levando à diminuição da amplitude de onda de bastonetes, mesmo sem perda visual completa. A miltefosina se mostrou eficaz no tratamento da doença clínica, porém promoveu poucas mudanças dos achados de fundoscopia e de ERG.

REFERÊNCIAS

ANDEREG P.I; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina – revisão. São Paulo – SP. **Clínica Veterinária**. São Paulo, n. 19, p. 31-38, 1999.

ARAGAO, R.E.M, et al. Intraretinal hemorrhage associated with visceral leishmaniasis. **Rev. Bras. Oftalmol.**, v. 74, n. 6, p. 393-395, 2015. doi: 10.5935/0034-7280.20150083

BALICKI, I; NESTOROWICZ, N; OFRI, R. Funduscopy abnormalities and electroretinography in cases of retinopathy in German Shepherd dogs. **Vet. Ophthalmol.**, v. 16, n. 6, p. 397–408, 2013. doi: 10.1111/vop.12007

BENASSI, J. C. **Detecção de *Leishmania spp.* por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e eqüinos.** 2015. (Dissertação) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74135/tde13102015.../ME7348626COR.pdf>. Acesso em: 10 de jan 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** – Brasília – Brasil: MS, 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf>. Acesso em: 23 de out 2017.

BRIFFOD, C. **Revue actuelle en matiere de leishmaniose canine.** These d'exercice (Médecine vétérinaire) – Universidade de Toulouse, 2011. Disponível em: <http://oatao.univ-toulouse.fr/4968/1/briffod_4968.pdf>. Acesso em: 23 de set 2017.

BRITO, F. et al. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 5, p. 768-775, 2006.

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

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral Leishmaniasis in

Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151 – 156, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003646652006000300007>. Acesso em: 12 de fev 2017.

Di PIETRO, S.; et al. Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned-client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. World.**, v. 9, n. 6, p. 633-637, 2016. doi: 10.14202/vetworld.2016.633-637

FULGÊNCIO, G. O. **Prevalência de oftalmopatias em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* no município de Belo Horizonte – estudo clínico e histopatológico**. 2006. (Dissertação) - Escola de Veterinária; Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. Disponível em:

<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MASA7BALM4/disserta__o_gustavo_de_oliveira_fulgencio.pdf?sequence=1>. Acesso em: 10 de mai 2017.

GALLEGO, E.; et al. Certain aspects of ocular lesions in canine visceral leishmaniasis. In: MEETING OF VETERINARY PATHOLOGIST, 4., 1986. **Proceedings...** Córdoba: European Society of Veterinary Pathology, 1986. p. 79.

GARCIA-ALONSO, M.; et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 18, p. 617-623, 1996. doi: 10.1046/j.1365-3024.1996.d01-39.x

GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat: Leishmaniasis**. 3^a ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p. 685-698.

KOMAROMY, A. M.; SMITH, P. J.; BROOKS, D. E. Electroretinography in dogs and cats. Part II. Technique, interpretation and indication. **Comp. Cont. Educ. Pract.**, v. 20, n. 3, p. 355-366, 1998.

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.** 2007. (Dissertação) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/SAGF-765GJ2>>.

Acesso em: 23 de nov 2017.

MANNA, L.; et al. Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1149, p. 358-360. 2008. Disponível em: <<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/toc/17496632/1149/1>>. Acesso em: 21 de fev 2017.

MANNA, L.; et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. **Vet. J.**, v. 182, p. 441-445. 2009. Disponível em: <http://www.academia.edu/22746181/Study_of_efficacy_of_miltefosine_and_allopurinol_in_dogs_with_leishmaniasis>. Acesso em: 10 de out 2017.

MAUDE, R.J., et al. Retinal changes in visceral leishmaniasis by retinal photography. **BMC Infect. Dis.**, v. 14, p. 527, 2014. doi: 10.1186/1471-2334-14-527

McCULLOSH, D.L., et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). **Doc. Ophthalmol.**, v. 130, n.1, p. 1-12, 2015. doi: 10.1007/s10633-014-9473-7

MOLLEDA, J. M. et al. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. **Isr. J. Vet. Méd.**, v. 48, p.173-178, 1993.

NARANJO, C. et al. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 133, p. 37-47, 2005. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.05.017

NOGUEIRA, F.S. **Avaliação clínico-laboratorial de cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral, submetidos à terapia com anfotericina B.** 2007. (Tese) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/101315/nogueira_fs_dr_bo_tfmvz.pdf;jsessionid=AB9D4F7D4EE73A837A410080B7369307?sequence=1>.

Acesso em 23 de maio de 2017.

ORIÁ, A.P.; PEREIRA, P.M.; LAUS, J.L. Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Ciênc. Rural.** Santa Maria, v.34, n.4, p.1289-1295, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n4/a55v34n4.pdf>>. Acesso em: 10 de fev 2017.

PEÑA, M.T; et al. Histopathological features of ocular leishmaniasis in the dog. **J. Comp. Path.**, v. 138, p. 32-39, 2008. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.09.004

PEÑA, 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. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/11942863_Ocular_and_periocular_manifestations_of_leishmaniasis_in_dogs_105_Cases_1993-1998>. Acesso em: 12 de fev 2017.

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

ROZE, M. Ophthalmologic implications in leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CONGRESSO CANINE LEISHMANIASIS, 2004. Nápolis, **Anais...**, Napolis: [s.n], 2004. p. 73-77.

SAFATLE, A. M.V.; et al. Determinação dos valores normais do eletrorretinograma de campo total em cães da raça Poodle portadores de catarata de acordo com a faixa etária. **Ciênc. Rural.** Santa Maria. v. 40, n. 3, p. 587-593. 2010. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384782010000300014&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em 12 de setembro de 2017.

SAHUQUILLO, C. Manifestaciones oculares en la leishmaniosis canina. **Inf. Vet.**, n. 8, p.39-43, 2005.

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, Suppl. 1, pages S17–S20, 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/100/Supplement_1/S17/1885883>. Acesso em: 10 de out 2017.

SOLANO-GALLEGO, L.; et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol.**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2001. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine visceral Leishmaniosis. In: CHARMICHAEL, L. **Recent advances in canine infectious diseases**. Ithaca: International Veterinary Information Service. 2004, p.1-14.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P.G. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 3, n. 5, p. 733-740, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2376078/>>. Acesso em: 10 de jul 2018.

VAN DER WOERDT, A. Management of intraocular inflammatory disease. **Clin. Tech. Small Anim. Pract.**, v. 16, n. 1, p. 58-61, 2001. doi: 10.1053/svms.2001.22807