

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937),
SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO TERAPÊUTICO
EM CLÍNICA VETERINÁRIA DE BELO HORIZONTE.**

SYDNEI MAGNO DA SILVA

**Belo Horizonte
2007**

Sydnei Magno da Silva

Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937), submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de Belo Horizonte.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Prof^a Marilene S. M. Michalick - UFMG

Co-Orientador: Dr. Vitor Márcio Ribeiro - PUC Betim

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2007

Dedico este trabalho ao meu pai e à minha mãe, fontes inesgotáveis de inspiração.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Gostaria de agradecer ao programa de Pós Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais na pessoa de seu atual coordenador, Prof. Pedro Marcos Linardi, pela oportunidade, apoio e incentivo, fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus e ao Divino Mestre e amigo, Jesus. Sem este alicerce espiritual, não conseguiria entender e suportar com fé, as provações diárias desta vida.

Pai, o senhor sempre foi minha inspiração, o exemplo de caráter no qual procurei moldar o meu. Agradeço-te pelo esforço em me educar, corrigir meus erros, e principalmente pelo apoio às escolhas que fiz. Quisera eu, nos meus mais íntimos sonhos, conseguir um dia, ser para alguém o exemplo de vida que és para mim. Te amo.

Mãe, ainda não há porto mais seguro que teu colo. Sem sua ajuda, não chegaria aqui. És meu exemplo de luta e superação. Seu esforço e dedicação para nos educar, não só do ponto de vista acadêmico, surtiu efeito. Agradeço-te mãezinha, por tudo que tens feito. Te amo incondicionalmente.

Nem (Raigna) e Ió (Leonardo), meus irmãos queridos! Agradeço por ter crescido junto a vocês. Cada um, a seu modo, me ensinou e ensina muito. Tiveram participação das mais importantes neste trabalho, quer seja em sugestões práticas, apoio moral, carinho e atenção, tão importantes em situações como esta.

Agradeço a Deus por permitir que eu nascesse e crescesse em uma família com laços tão fortes de amor e união como a nossa.

Renata, meu amor, o que dizer para te agradecer? Melhor, como te agradecer? Devo-te agradecimento diário, por todos os dias desta vida, pelo conjunto de benfeitorias que fez em meu coração. Me fez enxergar a vida com outros olhos. Obrigado pelo apoio, pelas idéias, pelo consolo, pela ajuda prática nas minhas apresentações e textos, opiniões, por simplesmente me ouvir, por batalhar em prol das minhas causas, como se fossem as suas. Amor, espero um dia retribuir o que tens feito por mim nestes quase dois anos. Te amo com todas as minhas forças!

Vôzinho, neste trabalho o senhor tem uma participação especial. Me lembro sempre das suas palavras de incentivo, do alto de seus 91 anos, dizendo que apesar do pouco estudo, se sentia realizado ao ver seus filhos e netos se formarem e alcançarem os objetivos através “do lápis e da caneta”.

Agradeço aos meus cunhados. Renata, valeu pelo apoio e força, e pela enorme boa vontade em ajudar. Guigo, valeu pelas idéias, ajuda com as fotos, cervejas e carinho. Agradeço também por me darem quatro sobrinhos maravilhosos: Bárbara, Letícia, Lucas e Sofia.

Agradeço ao meu tio querido. Riço, obrigado por ser um tio presente, preocupado, e de coração tão bom. Você sabe, te considero mais que um tio. Você é meu irmão, meu amigo. Você é iluminado!

Aos amigos, mesmo aqueles que não participaram diretamente do trabalho, me ajudaram a ter forças para tocar o barco para frente, a não desistir quando as coisas pareciam não dar certo.

Carlinha valeu por me apresentar àquela que viria a ser minha orientadora. Daniel e PH, pela força e companheirismo. Considero vocês como irmãos.

Paulão, a quem considero como irmão, pelas palavras de incentivo, pela confiança depositada em mim, pelas conversas e porres homéricos, e por escutar meus desabafos. Obrigado.

Agradeço as meninas da Estação Animal LTDA: Kênia, Adriana e Renatinha. Por me aturar, respeitar, e colaborar dentro das possibilidades que lhes cabiam. Sem o apoio delas, não teria conseguido chegar a este momento. Valeu meninas.

Agradeço a Beth, por me ensinar muito do que sei sobre a minha profissão. Só Deus sabe o quanto valeram os anos de estágio que me ofereceu.

Tive a felicidade de conhecer inúmeras pessoas nestes dois anos de mestrado. Fiz grandes amizades, aprendi muito. Agradeço a estas pessoas, que num piscar de olhos, passaram a fazer parte da minha vida.

Vou começar pela turma de mestrado de 2005, mais conhecida pela alcunha de “Família Mexicana”. Adoro estas meninas! Tem a Ana Flávia, a Priscila, a Carla, a Kelly, a Fernanda, a Ceres e a Renata.

Gostaria de fazer uma menção especial à Ceres (meninas, não fiquem enciumadas, certo?), que me ajudou muito no começo do curso, e ajuda até hoje, já que evolui muito pouco de lá pra cá. Obrigado pela preocupação e por estar sempre disposta a colaborar. Deus reserva um futuro brilhante pra você.

Mas a maior sorte mesmo, não poderia deixar de lembrar, foi conhecer aquela que viria a ser minha namorada e meu amor, a Renata.

Agradeço a Silvia, por estar sempre ao nosso lado. Por ser não só “a amiga da minha namorada”, mas minha amiga também. Valeu pela força, pelo senso crítico, conselhos e conversas, muitas vezes regadas por uma boa e gelada cervejinha. Tenho certeza que estes momentos vão durar por muito tempo ainda. Você é especial.

À Viviane, por ser uma amiga e companheira para toda hora. Tivemos ótimos momentos nestes dois anos. Não falo só das cervejas, mas das conversas, de sairmos juntos: eu, Renata, você e o Léo (grande figura), enfim, da nossa convivência. Que esta amizade se prolongue por muitos anos. Muito sucesso.

Ao Thales e a Jozi (e a Carol, claro), por termos nos conhecido e tornado amigos. Vocês, junto ao Wander (valeu pelo empréstimo do Laptop, você salvou minha vida meu amigo!) e a

Sheila, ao Lê e a Walzi, a Silvia e o Luiz, foram responsáveis por alguns dos momentos mais felizes que passei nestes dois últimos anos.

Gostaria de agradecer a querida Sumara. Valeu por tudo que fez por mim, e que faz por todos os alunos deste departamento. Você é muito especial. Que Deus te abençoe sempre.

Gostaria de agradecer a professora Lúcia Galvão pelas correções e sugestões no projeto de dissertação e a professora Adriane Costa Val pela revisão no *Abstract* desta dissertação.

Ao pessoal do NIPE: Marta, Eliane, Weverton, e demais alunos e técnicos. Aproveito o momento para agradecer quem me permitiu contato com estas pessoas maravilhosas, o professor Wagner Tafuri. Professor, mesmo com pouca convivência, só tenho elogios e gratidão para com o senhor. Não só pela competência, mas pela liberdade e apoio para execução deste trabalho. Obrigado do fundo do meu coração.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia de *Leishmania*, só tenho a agradecer, e muito!

À Soraia, sempre prestativa, valeu muito pela ajuda. Valeu mesmo.

À Rosângela, sempre bem humorada e solícita, pela ajuda inestimável nas PCR's. Muito obrigado!

Às meninas: Ângela, Janaína, Cíntia e Lara. Valeu por estarem ao meu lado, por demonstrarem sempre boa vontade em ajudar no que for possível. Sucesso!

Professora Norma, te agradeço do fundo do coração pelo carinho, compreensão, boa vontade, disposição em ajudar, pela excelente relatoria desta dissertação. Agradeço, sobretudo, pelo exemplo de humildade e competência. A senhora é a prova viva que estas duas qualidades tão nobres podem coexistir em um mesmo ser. Saiba que, dentre tudo que fez e faz por mim, ficará este exemplo, e a esperança de que eu possa algum dia segui-lo.

Izabela e Cíntia. Adoro vocês! A nossa amizade começou discreta, mas hoje posso dizer que são grandes amigas, que eu estimo demais. Vocês sempre me apoiaram, me escutaram, e me aturaram nestes dois anos. Sou profundamente grato por ter tido a oportunidade de conhecê-las. Sempre educadas e bem-humoradas, seus conselhos e dicas foram de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pelos nossos bate-papos informais. Que Deus ilumine seus caminhos em direção ao sucesso, porque a competência vocês já possuem.

Chegamos finalmente ao Laboratório de Sorologia. Nele, é impossível deixar de notar o clima de união e bom humor que reina.

Adoro a Elza, super educada, carinhosa, prestativa e competente. Você sabe que é sincero o carinho que tenho por você. É para mim um sinônimo de dedicação, força de vontade, e honestidade. Adoro poder chegar ao laboratório e conversar com você enquanto tomamos “aquele cafezinho”. Elza, sou grato por ter tido a chance de poder conviver e aprender com você. Que continue a receber as bênçãos da Virgem Santíssima por toda sua vida.

Edilene, valeu pelo apoio, por ser tão prestativa, pelo interesse em ajudar, pelas palavras de conforto nas horas difíceis. Lembre-se sempre: você é especial.

Rosa, te agradeço pelos bate-papos, dicas, e pela ajuda neste trabalho. Obrigado!

Ludmila, obrigado por participar da minha vida nestes dois anos, desde o processamento de exames dos animais do meu projeto, até o fornecimento dos deliciosos chocolates. Muito obrigado.

Eloísa, você é especial! Tive a felicidade de conviver e aprender com você nestes dois anos, de podermos papear, de contarmos casos, de tomarmos cerveja, de trabalharmos juntos. Obrigado por ser tão prestativa e tão disposta a ajudar.

Raul, você é “O cara”! Tenho muita consideração por você. Sempre me ajudou quando precisei. Suas idéias, conceitos e dicas, em muito acrescentaram a esta dissertação. Tens um futuro dos mais brilhantes pela frente, pois tem competência e caráter de sobra para isto. Valeu meu velho!

Ao Dr. Vítor Márcio Ribeiro, meus mais sinceros agradecimentos. Por abrir as portas da sua Clínica para a realização deste trabalho, pela sua competência, carinho, educação, pelo caráter, pela bandeira levantada e conduzida, praticamente sozinho, em prol da causa do tratamento da leishmaniose visceral canina. Isto o torna para mim, não só o co-orientador da minha dissertação, mas um exemplo de profissional e pessoa, do qual procuro me espelhar, e que tentarei perpetuar.

Gostaria de agradecer imensamente a colaboração irrestrita da equipe técnica e administrativa da Clínica Veterinária Santo Agostinho[®]. Prefiro não citar todos nomes ou cargos, pois acredito que cada um assumiu um papel igual neste processo. Tenho sincera gratidão por tudo que fizeram para mim, pelo exemplo de trabalho em equipe e pela boa vontade. Fica aqui um agradecimento especial para a Rosana, que me surpreendeu pela educação, respeito, carinho, pela vontade de colaborar, e pelo empenho em nos ajudar. Acho que ela é a personificação do espírito de todos os demais funcionários da Clínica. Rosana, que Deus lhe abençoe e a todos os demais.

Agradeço a colaboração irrestrita e a total compreensão dos proprietários dos cães participantes deste trabalho. Sem isto, não poderíamos ter concretizado este estudo.

Não posso me furtar de agradecer os cães que participaram deste trabalho, pois em última instância, este trabalho só foi possível graças a eles e por causa deles.

Achou que iria te esquecer, não é professora Marilene?

Há algum tempo venho tentando formular um agradecimento que expresse realmente minha gratidão por você. Mas como agradecer uma pessoa que entrega as chaves do laboratório para um veterinário há quatro anos afastado do mundo acadêmico, no primeiro dia de estágio? Difícil.

A uma pessoa da qual nunca ouvi proferir qualquer palavra mais rude, mais áspera, mesmo nas situações em que estas eram cabíveis? Improvável.

A uma pessoa que luta e trabalha tanto quanto, às vezes mais até, que seus orientados, perdendo um sem número de noites de sono, de horas de descanso, feriados, férias, só para corrigir nossos textos (mal escritos, diga-se de passagem)? Complicado.

Àquela pessoa, que é ao mesmo tempo orientadora; amiga; conselheira; professora; mãe; irmã; exemplo de vida; superação; e profissionalismo? Impossível.

Por isto, professora querida, este aluno pede humildemente que compreendas quando ao final destes devaneios, conseguir dizer apenas: Mãerilene, obrigado, do fundo do meu coração!

Minhas convicções religiosas me permitem dizer que nada acontece por acaso nesta vida. Que os laços que unem as pessoas nesta vida são mais fortes que possamos imaginar. Peço perdão àqueles que por esquecimento deixei de citar nas modestas palavras acima. Para vocês, e para todos aqueles que participaram de alguma maneira da minha vida, faço minha a seguinte mensagem:

AMOR FRATERNAL

Permaneça o amor fraternal.

Paulo (Hebreus, 13:1)

“As afeições familiares, os laços consangüíneos, as simpatias naturais podem ser manifestações muito santas da alma, quando a criatura as eleva no altar do sentimento superior, contudo, é razoável que o espírito não venha a cair sob o peso das inclinações próprias.

O equilíbrio é a posição ideal.

Por demasia de cuidado, inúmeros pais prejudicam os filhos.

Por excesso de preocupações, muitos cônjuges descem às cavernas do desespero, defrontados pelos insaciáveis monstros do ciúme que lhes aniquilam a felicidade.

Em razão da invigilância, belas amizades terminam em abismo de sombra.

O apelo evangélico, por isto mesmo, reveste-se de imensa importância.

A fraternidade pura é o mais sublime dos sistemas de relações entre as almas.

O homem que se sente filho de Deus e sincero irmão das criaturas não é vítima dos fantasmas do despeito, da inveja, da ambição, da desconfiança. Os que se amam fraternalmente alegram-se com o júbilo dos companheiros; sentem-se felizes com a ventura que lhes visita os semelhantes.

Afeições violentas, comumente conhecidas na Terra, passam vulcânicas e inúteis.

Na teia das reencarnações, os títulos afetivos modificam-se constantemente. É que o amor fraternal, sublime e puro, representando o objetivo supremo do esforço de compreensão, é a luz imperecível que sobreviverá no caminho eterno.”

Francisco Cândido Xavier.

Ditado pelo Espírito Emmanuel.

“O poder nasce do querer. Sempre que alguém aplica a veemência e a perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá todos os obstáculos, e, se por acaso não atingir o alvo, fará pelo menos coisas admiráveis.”

José de Alencar

COLABORADORES

Este trabalho contou com a colaboração da professora Dra. Maria Norma de Melo, do Laboratório de Biologia de *Leishmania* do ICB-UFMG, do professor Dr. Wagner Luiz Tafuri do Laboratório de Neuroimunopatologia Experimental (NIPE) do ICB-UFMG.

FINANCIADORES

Este trabalho foi financiado por recursos obtidos através de projetos de prestação de serviços mantidos pelo Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, e pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), através do fornecimento de bolsa de estudo.

RESUMO

A leishmaniose visceral no Brasil é uma zoonose que tem no cão doméstico o principal reservatório. O tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) é polêmico e no Brasil é praticado desde os meados da década de 90. Este trabalho é o primeiro a avaliar de forma sistematizada um protocolo de tratamento que utiliza Anfotericina B e Alopurinol em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, e que estão domiciliados no município de Belo Horizonte, Minas Gerais. Trinta e um cães submetidos a este protocolo em uma clínica veterinária deste município, entre janeiro de 2004 e dezembro de 2005, foram avaliados sob a ótica dos seguintes parâmetros: exame clínico; sorologia; imuno-histoquímica e PCR de fragmento de pele de orelha; hemograma e bioquímica sérica. Os resultados foram comparados com aqueles realizados imediatamente antes dos animais serem submetidos ao tratamento. Demonstrou-se melhora significativa em todos os parâmetros avaliados. Ao exame clínico foi observado em todos os cães o uso de medidas profiláticas contra a ação dos flebotomíneos, como coleiras impregnadas com Deltametrina a 4% ou repelentes tipo *Top spot* a base de Permetrina. O peso médio dos animais no intervalo de tempo entre o início do tratamento e o momento da avaliação foi aumentado em 12,68%. Antes do tratamento, 30 cães (96,78%) foram categorizados como sintomáticos. No momento da avaliação 25 animais (80,65%) estavam assintomáticos. A técnica da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi o teste utilizado para a comparação dos níveis de anticorpos apresentados pelos cães antes e durante o acompanhamento da resposta ao tratamento. Antes do tratamento o valor máximo de diluição reativa final observado foi 1:20.480 e o mínimo 1:320, com média em 1:4.335. No momento da avaliação, estes valores eram no máximo 1:10.240 e o mínimo menor que 1:40 (considerado não reativo), com média em 1:1.190. A técnica de imuno-histoquímica mostrou ausência de parasitos na pele da face interna orelha em 93,55% dos animais no momento da avaliação enquanto antes do tratamento este percentual era de 45,16% estavam negativos.

Antes do tratamento 29,03% dos animais eram PCR negativo no mesmo fragmento de pele, já no momento da avaliação em 80,65% dos animais a mesma técnica apresentou resultado negativo. Todos os cães apresentaram PCR de sangue periférico negativo. Houve aumento no percentual de animais com a relação Albumina/Globulina maior que 0,6 de 64,51% antes do tratamento para 90,32% no momento da avaliação. A significativa melhora clínico - laboratorial apresentada pelos animais na avaliação deste trabalho, aliada a participação consciente e colaboradora dos seus proprietários, e a adoção de medidas de controle da infecção centradas nos animais, minimizam o risco da permanência destes cães em seus domicílios, considerando um município endêmico para LVC como Belo Horizonte.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, tratamento, Anfotericina B, Alopurinol, Belo Horizonte.

ABSTRACT

RESUMO

American visceral leishmaniasis is a zoonotic disease having domestic dogs as the main reservoir. In Brazil canine visceral leishmaniasis have been treated for more than fifteen years. In this work thirty one dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* that lives in Belo Horizonte, capital of Minas Gerais State, were treated in a reference veterinary clinic with a therapeutical protocol using Amphotericin B and Allopurinol, between January 2004 and December 2005. They were evaluated according to clinical status, serological parameters, immunohistochemical and PCR techniques, using skin biopsies of ear, besides hematological and biochemical parameters. The results of this evaluation were compared with pre-treatment data and showed statistically significant improvement to all parameters analyzed. All dogs wore deltamethrin impregnated collars or permethrin top spot solutions against sand fly bites during the time of the experiment. It was observed weight gain in the order of 12,68% related to dog's weight before treatment. Before treatment 30 (96,78%) dogs were symptomatic. At the clinical evaluation 25 (80,65%) were asymptomatic. Immunofluorescent antibody assay (IFAT) was used to evaluate antibody levels before and during treatment. The variation of IFAT titers before treatment was 1:320 to 1:20,480 (mean = 1:4,335). These values changed to non reactive at 1:10,240 (mean= 1:1,190) at the time of our evaluation. Immunohistochemical assay in skin biopsies of ear, showed no parasite in 29 (93,55%) dogs at the moment of our evaluation, in contrast with 14 (45, 16%) negatives results before treatment was started. PCR was performed to the same material and the result was negative to 25 (80,65%) dogs at the moment of our evaluation while 9 (29,03%) dogs have showed negative result before treatment. PCR results for peripheral blood samples was

negative for all dogs at the moment of our evaluation. The albumin/globulins ratio was higher than 0,6 in 20 (64,51%) dogs before treatment and increased to 28 (90,32%) dogs during our evaluation. The results found in this work points to an improvement in clinical and parasitological status of treated dogs against visceral leishmaniasis using Amphotericin B and Allopurinol, and suggests a decrease in the risk of these animals can infect the sand fly. The treatment presented here together with other measures as owner collaboration and sand fly control can no doubt contribute to a better control of this disease.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, treatment, Amphotericin B, Allopurinol, Belo Horizonte.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1	Número de cães com presença ou ausência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em período de manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica	84
GRÁFICO 2	Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em período de manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica	85
GRÁFICO 3	Resultado da imuno-histoquímica realizada em fragmento biopsiado de pele da face interna de uma das orelhas de cães submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica	88
GRÁFICO 4	Resultado da PCR de fragmentos de pele biopsiado da face interna de uma das orelhas de cães submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica	89

GRÁFICO 5	Relação entre albumina e globulinas séricas, em cães submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B em manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica	91
QUADRO 1	Iniciadores utilizados nas amplificações pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	74
QUADRO 2	Componentes da reação em cadeia da polimerase (PCR) específica por tubo de Reação	75
QUADRO 3	Grupo de cães selecionados, de acordo com a raça, sexo, idade, e sinais clínicos de leishmaniose visceral apresentados ao início do tratamento	 ANEXO D

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Relação entre o número de amostras analisadas no Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG do ICB procedente de três clínicas veterinárias de Belo Horizonte e o resultado de exame de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), entre janeiro de 2004 e dezembro de 2005	 78
TABELA 2	Cães candidatos ao tratamento para leishmaniose visceral por clínica veterinária, selecionados pela repetição da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em diluição reativa final do soro	 79
TABELA 3	Número de animais e respectivo valor da diluição reativa final da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), antes do tratamento e no momento da avaliação clínica	 86
TABELA 4	Comparação entre os resultados obtidos pela realização de imuno-histoquímica e de PCR em fragmento biopsiado de pele da face interna de uma das orelhas de cães, submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica	 89
TABELA 5	Comparação entre os resultados obtidos no hemograma em cães submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica	 90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANCLIVEPA	Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais
A/G	Relação Albumina/Globulinas séricas
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CR1	<i>Complement receptor 1</i>
CR3	<i>Complement receptor 3</i>
DAB	Diaminobenzidina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme lynked immunosorbent assay</i>
gp63	Glicoprtoeína de 63 kilodaltons
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgG	Imunoglobulina da subclasse G
LPG	Lipofosfoglicanos
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
MS	Ministério da Saúde
NIPE	Laboratório de Neuroimunopatologia Experimental
OIE	<i>Office International des Epizooties</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organización Panamericana de la Salud
OPD	ortofenilenodiamina
pb	Pares de base
PBS	<i>Phoshate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

pH	Potencial hidrogeniônico
PUC	Pontifícia Universidade Católica
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuclease
SBMV	Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária
TBE	Tris-Borato-EDTA
TDR	Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
TE	Tris-EDTA
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	<i>World Health Organization</i>
°C	Graus Celsius
dL	Decilitro
g	Gravidade
kg	Quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
pmol	Picomoles
N	Normal
nm	Nanômetros
µg	Micrograma
µl	Microlitro
ω	Frequência
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	24
2 – REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1 – CICLO BIOLÓGICO	32
2.2 – EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL	34
2.3 – O CÃO NA EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL	36
3 – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	41
4 – DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	45
4.1 – ALTERAÇÕES EM EXAMES LABORATORAIS	47
5 – TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	49
6 – OBJETIVOS	61
6.1 – OBJETIVO GERAL	62
6.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
7 – MATERIAL E MÉTODOS	61
7.1 – SELEÇÃO DA CLÍNICA VETERINÁRIA	64
7.2 – SELEÇÃO DA AMOSTRA	64
7.2.1 – CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	65
7.2.2 – ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS	65
7.2.3 – ANUÊNCIA DO PROPRIETÁRIO	66
7.2.4 – AVALIAÇÃO CLÍNICO LABORATORIAL DOS PACIENTES	66
7.2.5 – COLETA E PREPARAÇÃO DE MATERIAL PARA ANÁLISE LABORATORIAL	67
7.2.6 – EXAMES SOROLÓGICOS	68
7.2.7 – HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA	70
7.2.8 – IMUNO-HISTOQUÍMICA	70
7.2.9 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	71
7.3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	76
8 – RESULTADOS	78
8.1 – SELEÇÃO DA AMOSTRA	78
8.2 – PROTOCOLO DE TRATAMENTO	80
8.3 – EXAME CLÍNICO DOS PACIENTES	82
8.4 – EXAMES LABORATORIAIS	85
8.4.1 – EXAMES SOROLÓGICOS	85
8.4.2 – IMUNO-HISTOQUÍMICA	87
8.4.3 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	88
8.4.4 – HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA	90
8.4.5 – RELAÇÃO ALBUMINA/GLOBULINAS (A/G)	91
9 – DISCUSSÃO	77
10 – CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças que determinam grave problema de saúde pública. Há estimativa de prevalência global de 14 milhões de casos em 88 países, 79 destes são considerados subdesenvolvidos, com incidência anual de 1,5 a 2,0 milhões de casos, sendo 1,0 a 1,5 milhões de pessoas acometidas por leishmaniose tegumentar e 500.000 por leishmaniose visceral (ALVAR et al., 2004).

As primeiras observações da leishmaniose visceral (LV) foram feitas na Índia por Cunningham, no final do século XIX, em indivíduos acometidos pelo *Kala-Azar*, ou “doença negra”. William Leishman e Charles Donovan, em 1901, descreveram quase simultaneamente o agente da LV em um soldado inglês e em uma criança hindiana, respectivamente. Em 1903, Ross criou o gênero *Leishmania*, denominando *Leishmania donovani* o agente etiológico do calazar indiano (Alves, 2006). Este gênero abriga um grande número de espécies, das quais cerca de vinte e duas são causadoras de afecções cutâneas ou viscerais em seres humanos (ALVAR et al., 2004; DESJEUX, 2004).

As manifestações clínicas associadas à LV têm sido atribuídas ao parasitismo por protozoários digenéticos pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Estes parasitos pertencem ao complexo *Leishmania donovani*, que é representado pelas espécies *L. (Leishmania) donovani*, *L. (L.) archibaldi*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (CUPOLILLO; 2006; LAINSON & SHAW, 1987; MAURICIO, 2001).

L. chagasi e *L. infantum* de várias regiões geográficas possuem diferenças mínimas, não tendo sido possível a distinção entre elas por estudos bioquímicos e moleculares (MAURICIO et al. 2000; 2001). Assim, estes autores indicam que as duas espécies devam ser consideradas como um grupo monofilético. Entretanto, neste trabalho consideraremos *L. infantum* o agente etiológico da LV no Velho Mundo e no Novo Mundo a *L. chagasi*.

Os hospedeiros invertebrados do parasito são dípteros conhecidos por flebotomíneos, sendo todas as espécies transmissoras incluídas nos gêneros *Phlebotomus* - vetoras de *L. infantum* - e *Lutzomyia*, as vetoras de *L. chagasi* (ALVAR et al., 2004). No Brasil, duas espécies estão relacionadas com a transmissão de *L. chagasi*: *Lutzomyia longipalpis*, que é considerada a principal transmissora e *Lutzomyia cruzi*, incriminada recentemente como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul (ELKHOURY, 2005).

O cão é o mais importante reservatório, quando se considera a forma zoonótica da doença (ALVAR et al., 2004), sendo responsável pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, quer pela alta prevalência da doença nestes animais, quer pela presença de formas amastigotas na pele e pela sua proximidade ao homem. Por esta razão estes animais são considerados um dos alvos estratégicos de controle da doença (ALVES, 2006; COSTA VAL, 2004).

A LV é endêmica em 65 países, com registro anual de mais de 90% dos 500 mil casos novos concentrados nos países Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil (ALVAR et al., 2004; DESJEUX, 2004). Nas Américas, cerca de 90% dos casos humanos de (LV) têm sido registrados no Brasil e atualmente 20 (74%) das 27 Unidades Federadas, apresentam casos autóctones (ALVES, 2006).

O Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR), que tem como foco doenças negligenciadas que afetam desproporcionalmente populações pobres e marginalizadas, coloca as leishmanioses como afecções de prioridade um entre as dez endemias abordadas pelo Programa (WHO, 2005).

Em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da LV no Brasil, associado a questões de ordem operacional, as estratégias de controle desta endemia têm se mostrado pouco efetivas. Estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da

população de flebotomíneos vetores, eliminação dos reservatórios domésticos e atividades de educação em saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

É preciso considerar que a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organización Panamericana de la Salud (OPAS), embora recomendem a eutanásia dos cães soropositivos como medida de controle, reconhecem que existem animais de grande valor afetivo, econômico, zootécnico e prático, e que por isso não devem ser indiscriminadamente sacrificados (WHO, 2005; OPAS, 2006).

O tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) não é novidade, sendo bem documentado pela comunidade científica ao longo dos anos. No Brasil, em 1997, a Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (ANCLIVEPA) - Regional Minas Gerais - embasada em encontros, simpósios e conferências com pesquisadores internacionais, literatura científica, debates com a sociedade e seus associados, declarou através de um comunicado em seu periódico BOLETIM DA ANCLIVEPA, sua adesão e a recomendação de protocolos de tratamento para a LVC. Em 2002, a ANCLIVEPA NACIONAL referendou esta recomendação, em comunicado distribuído às associações regionais de todo o país, visando suprir o ônus emocional dos proprietários causado pela eutanásia dos seus cães (RIBEIRO, 2006).

A questão do tratamento da LVC envolve atualmente diversos setores da sociedade, incluindo o serviço de saúde pública, como exemplificado no trecho extraído da nota técnica da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, em 29 de setembro de 2005, intitulada **Posição oficial do Ministério da Saúde quanto ao tratamento da LVC:**

“A partir do ano de 2002, quando da VI REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM LEISHMANIOSES, levantou-se a necessidade de criar grupos de discussões nos quais estivessem inseridos, além das diversas instituições

governamentais, também os da classe médica veterinária. Diante disso, o Ministério da Saúde (MS), mesmo não recomendando o tratamento canino como medida de controle, iniciou discussões com a ANCLIVEPA, Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) e Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária (SBMV) referentes a uma proposta de normatização, padronização e fiscalização do tratamento canino para clínicos veterinários. Em 2004 e 2005, o MS promoveu cinco reuniões técnicas com representantes do CFMV, SBMV, ANCLIVEPA e consultores do MS. Como produto das primeiras reuniões, com representantes do CFMV, SBMV, ANCLIVEPA e consultores do MS, esta Secretaria promoveu uma oficina técnica durante a VIII REUNIÃO DE PESQUISA APLICADAS EM LEISHMANIOSES, em 24 de outubro de 2004, em Uberaba, MG. E, em 2005, foi realizada nova reunião com o mesmo grupo de trabalho, a fim de elaborar uma proposta que fosse exeqüível e não comprometesse as ações de controle ora desenvolvidas pelos estados e municípios.” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005b).

Miró (2005) avalia o tratamento da LVC sob o aspecto de sua evolução, desde as primeiras tentativas iniciadas na década de 70. A autora atribuiu a alta frequência de insucessos terapêuticos ao diagnóstico laboratorial ineficiente, protocolos terapêuticos incorretos, início de tratamento tardio em relação à evolução da doença, somados a reavaliações mal conduzidas dos casos.

A partir dos anos 90, o tratamento da LVC deu um salto de qualidade muito grande, ancorado principalmente no desenvolvimento de metodologias de diagnóstico mais precisas, em protocolos terapêuticos mais adequados, na associação com terapias de suporte eficientes e individualizadas, e em proprietários mais conscientes e colaboradores, o que permitiu o sucesso na resposta ao tratamento dos cães (MIRÓ, 2005).

Na Europa, autores têm demonstrado a eficácia do tratamento da LVC na redução da

prevalência da doença canina em regiões onde ele é utilizado como forma de controle, e até neutralização da capacidade infectante de cães tratados, por meio de exames imunohistoquímicos da pele e xenodiagnósticos negativos (MIRÓ, 2005).

A eutanásia de cães, na maioria dos casos torna-se uma opção difícil, devido a estreita relação afetiva entre os animais de companhia e seus proprietários. O estudo de Raina et al. (2005) exemplifica esta afirmação. Os autores avaliaram a relação entre a posse de um animal de estimação e aspectos ligados à saúde física e mental de pessoas idosas. Concluíram que aqueles idosos proprietários de animais de estimação possuem melhores indicadores de saúde física e mental, quando comparados àqueles que não possuem animais de estimação.

Desde meados da década de 90 o tratamento da LVC vem sendo praticado no Brasil e tem sido relatado a eficácia de diferentes protocolos terapêuticos no tratamento de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Foram notificados a melhora dos parâmetros clínicos e laboratoriais, além da diminuição da carga parasitária na pele dos animais submetidos a estes diferentes protocolos (RIBEIRO et al., 1997; RIBEIRO et al., 1999; RIBEIRO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2006; TAFURI et al., 1999).

O presente projeto baseia-se no fato de que o tratamento de cães com LVC é uma realidade em Belo Horizonte, onde algumas clínicas veterinárias são, hoje, referências em nível nacional no que diz respeito ao tratamento desta doença. Considerando a escassa produção científica sobre animais submetidos ao tratamento para LVC no Brasil, nos propusemos a uma avaliação da condição clínica e parasitológica de cães portadores de LVC, tratados no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2005, observando-se protocolos terapêuticos aceitos pela comunidade científica, e que se encontram domiciliados em Belo Horizonte.

REVISÃO DE LITERATURA

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – CICLO BIOLÓGICO

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários heteroxênicos pertencentes à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae. O ciclo biológico destes parasitos se realiza em um hospedeiro invertebrado, que por possuir capacidade vetorial, é o responsável pela transmissão aos hospedeiros vertebrados, nos quais a forma parasitária é intracelular obrigatória (SACKS & KAMHAWI, 2001).

O ciclo da *Leishmania* se inicia quando uma fêmea do inseto vetor realiza o repasto sanguíneo em um mamífero parasitado e ingere junto com o sangue células do sistema mononuclear fagocitário contendo formas amastigotas, que permanecem com o sangue ingerido, no intestino do inseto vetor, contido pela membrana peritrófica. Após um período de 12h a 18h, se transformam em formas pequenas, ovóides, e de pouco movimento, chamadas promastigotas procíclicas. Estas formas possuem moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície, que interagem com lectinas presentes no intestino do inseto, impedindo que sejam eliminadas junto com o alimento digerido (CARDOSO & CABRAL, 1999; OLIVER et al., 2005; SACKS & KAMHAWI, 2001).

As promastigotas procíclicas se multiplicam intensamente, e cerca de 30h a 60h, ocorre a transformação em formas alongadas, finas, com relativa motilidade, denominadas nectomonas. Estas formas aderem-se, via flagelo, às microvilosidades do epitélio celular do intestino médio do flebotomíneo. Cerca de sete dias após, quando se completa a digestão do sangue ingerido, estas formas migram para a região torácica do intestino, onde algumas se transformam em promastigotas, chamadas haptomonas, que rapidamente se transformam em formas finas, curtas, altamente ativas, e com flagelo medindo no mínimo o dobro do

comprimento do corpo, as promastigotas metacíclicas. Estas, são infectantes para o hospedeiro vertebrado e migram através da válvula estomodeu para o esôfago, faringe e probóscida (CARDOSO & CABRAL, 1999; KILLICK-KENDRICK, 2002; SACKS & KAMHAWI, 2001).

Na sua superfície, as promastigotas metacíclicas expressam grande quantidade de LPG, e de gp63 - uma protease zinco dependente - que em conjunto são responsáveis tanto pela proteção do parasito da ação de enzimas líticas no hospedeiro invertebrado, quanto da ação das células de defesa do hospedeiro vertebrado (OLIVER et al., 2005).

Ao realizar novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado susceptível, as formas infectantes de *Leishmania* são inoculadas diretamente da probóscida e por regurgitação, junto com a saliva do inseto (CARDOSO & CABRAL, 1999).

Alguns pesquisadores relatam que a saliva dos flebotomíneos exerce importante papel na transmissão de *Leishmania*, potencializando a infecção, quer seja pela sua capacidade anticoagulante, quer por conter peptídeos de grande poder vasodilatador (CASTRO-SOUSA et al., 2001; KILLICK-KENDRICK, 2002).

As formas promastigotas metacíclicas, no hospedeiro vertebrado, evadem da lise mediada pelo sistema complemento e usam a interação com as moléculas deste sistema para se estabelecerem como parasitos intracelulares (CARDOSO & CABRAL, 1999; OLIVER et al., 2005). O LPG, nesta fase, protege o parasito da ação do complexo C_{3b}-C₉ do complemento, responsáveis pela lise celular. A gp63 também previne a ação do complemento, através da clivagem de C_{3b} em C_{3bi} (OLIVER et al., 2005).

A opsonização do parasito pelas moléculas de C_{3b} em C_{3bi} favorece a internalização do mesmo através dos receptores CR1 e CR3 para o complemento, presentes na membrana do

macrófago. Outras moléculas como os receptores fucose-manose e proteína C-reativa presentes na superfície de macrófagos interagem com o LPG, contribuindo assim, para a internalização do parasito (OLIVER et al., 2005).

Após a internalização, as formas promastigotas metacíclicas, vulneráveis a acidez e a ação das enzimas líticas do fagolisossomo, se diferenciam em formas amastigotas (CARDOSO & CABRAL, 1999; OLIVER et al., 2005). Estas se multiplicam por divisão binária até a morte e o rompimento do macrófago infectado (KILLICK-KENDRICK, 2002). As formas amastigotas liberadas, por processo semelhante ao descrito, são capazes de infectar outras células do sistema mononuclear fagocitário (CARDOSO & CABRAL, 1999). O flebotomíneo ao realizar o repasto sanguíneo neste indivíduo, ingere junto ao sangue macrófagos infectados, perpetuando o ciclo biológico do parasito.

2.2 – EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV ocorre em áreas tropicais e subtropicais do mundo, estando distribuída em todos os continentes, à exceção da Oceania e Antártida (WHO, 2005). Na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Kênia, o agente etiológico da LV é *L. donovani*, onde a doença possui um perfil antroponótico (TAVARES et al., 2003).

Na Ásia central e sudoeste, no nordeste da China, norte da África e Europa mediterrânea é causada por *L. infantum*, e nos 12 países em que ocorre nas Américas, o agente etiológico é considerado *L. chagasi*. Independente do parasito a doença é de perfil zoonótico (MAURÍCIO et al. 2001). Devido à semelhança molecular encontrada entre os dois parasitos, recentemente, Lainson & Shaw (2005) citado por Lainson & Rangel (2005), consideraram nas como subespécies: *L. infantum infantum* e *L. infantum chagasi*. Neste trabalho adotaremos a nomenclatura *L. (L.) chagasi* para o agente etiológico da LVC.

A OMS estima que a incidência anual da LV seja em torno de 500 mil novos casos (ALVAR et al., 2006; WHO, 2005) e de 59 mil óbitos a cada ano, número só superado pelas mortes causadas por malária, no caso das doenças parasitárias (ALVAR et al., 2006; DESJEUX, 2004). Desjeux (2004) afirma que o número de óbitos anual devido à LV provavelmente seja subestimado, tendo em vista que a doença só é notificada compulsoriamente em 32 dos 88 países em que ocorre, e que em muitos casos não é diagnosticada como tal.

Alguns autores destacam que é alta a correlação entre a condição socioeconômica da população e a doença (ALVAR et al., 2006; DESJEUX, 2004; WHO, 2005). Dantas-Torres & Brandão-Filho (2006) relatam que cerca de 80% das vítimas de LV sobrevivem com o equivalente a dois dólares americanos por dia. Alvar et al. (2006) citam que a maioria dos fatores de risco de se contrair LV estão associados à baixa renda *per capita*, o que contribui para aumentar os índices de morbidade e mortalidade da doença.

O Brasil é responsável pela quase totalidade dos casos de LV na Américas, sendo que no período compreendido entre os anos de 1984 a 2004, a média anual de casos de LV foi de 3.352 registros com uma incidência de dois casos para cada 100.000 habitantes, apresentando tendência ao crescimento. A letalidade média neste mesmo período foi de 6,3%, entretanto observou-se aumento de 100%, passando de 3,6% em 1994 para 7,4% em 2004 (ELKHOURY, 2005).

A doença está distribuída nas diferentes faixas etárias, porém ocorre com maior frequência em crianças de até 10 anos (59%), sendo 46% dos casos registrados em menores de cinco anos. O gênero masculino é proporcionalmente o mais atingido (60,4%) (ELKHOURY, 2005).

A LV no Brasil é considerada zoonose de zonas rural, peri-urbana e urbana. Atualmente, é apontada como doença reemergente, caracterizada por nítido processo de transição epidemiológica, apresentando incidência crescente nas áreas onde ocorria tradicionalmente,

expansão geográfica para os estados mais ao sul do país e franco processo de urbanização em cidades localizadas nas regiões nordeste e sudeste (ALVES & BEVILACQUA, 2004). As cidades de Santarém e Boa Vista (Região Norte); Teresina, São Luis, Natal e Aracaju (Região Nordeste); Montes Claros, Belo Horizonte, Sabará e Rio de Janeiro (Região Sudeste), Cuiabá, Campo Grande e Palmas (Região Centro-Oeste) vivenciam ou já vivenciaram recentemente, epidemias de LV humana (LVH) e canina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005a).

No Estado de Minas Gerais, segundo dados referentes à frequência de casos confirmados no Boletim Epidemiológico da Superintendência de Epidemiologia da Secretaria de Estado de Saúde, até a 50^a semana do ano de 2006 haviam sido notificados 315 casos humanos de LV (SECRETARIA DE SAÚDE, 2006).

Nos últimos anos o número de casos de humanos e caninos de LV na região metropolitana de Belo Horizonte tem aumentado, sugerindo mudança no padrão de transmissão da doença (MARGONARI et al., 2006; SILVA et al., 2001). Entre 1994 e 2004, foram registrados 637 casos humanos de LV no município de Belo Horizonte. O coeficiente médio de incidência no município foi de 2,7 novos casos por cada 100.000 habitantes, sendo que esta taxa era 1,39 no primeiro ano e passou para 5,5 no ano de 2004, demonstrando nítido processo de crescimento. O município confirmou, até o dia 12 de dezembro, 91 casos da doença no ano de 2006, com oito óbitos (PREFEITURA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE, 2006).

2.3 – O CÃO NA EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O papel dos canídeos na epidemiologia da LV foi suscitado quando, na Tunísia em 1908, Nicolle & Comte demonstraram o parasito na pele de cães acometidos pela doença, sugerindo que estes animais poderiam atuar como reservatório do parasito (ALVES, 2006). Esta sugestão foi reforçada pelos estudos de Laveran (1914) no Instituto Pasteur, que reproduziu a infecção experimental por *L. infantum* em 25 cães, encontrando e descrevendo o parasito na

pele e outros órgãos destes animais.

No Brasil ao final da década de 30, foram descritos casos isolados de cães naturalmente infectados, em área de ocorrência da infecção humana (DEANE, 1956). A condução de um amplo estudo em 1955 no Estado do Ceará, uma área de grande endemicidade para LV, reforçou a importância dos canídeos na epidemiologia da doença (ALVES, 2006). Este estudo, realizado por Deane (1956) comparou a infecção humana e canina por *L. chagasi*, onde os autores encontraram parasitos na pele de cerca de 16% dos homens estudados, e de quase 78% na pele de cães. Outra observação deste trabalho foi a capacidade de infecção experimental de flebotomíneos alimentados em cães (75%) e no homem (29%).

Outros membros da família Canidae também são apontados como reservatórios: *Licalopex vetulus* (DEANE, 1956); *Cerdocyon thous* (CURI et al., 2006; LAINSON & SHAW, 1987). De forma geral, apenas os cães desempenham papel importante na transmissão de *L. chagasi* para o homem, ficando aos demais canídeos a manutenção do ciclo silvestre da LV (ALVAR et al., 2004).

L. chagasi já foi descrita também em outros animais como o gato doméstico (*Felis catus*), marsupiais (*Didelphis albiventris*, *D. marsupialis*) e roedores (*Rattus rattus*; *Nectomys squamipes*; *Proechimys canicollis*) (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; OLIVEIRA et al., 2005; PENNISI, 2002). Entretanto, o papel destes animais em relação à epidemiologia da LV carece de mais estudos, para determinar sua relevância no contexto da transmissão ao homem (ALVAR et al., 2004; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006).

Os cães preenchem as condições necessárias para serem considerados reservatórios de *L. chagasi*, por serem altamente susceptíveis à infecção, por possuírem alto parasitismo cutâneo, e principalmente pelo seu convívio junto ao homem (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-

FILHO, 2006).

A infecção canina geralmente precede o aparecimento de casos humanos sendo ainda, mais prevalente que a doença humana. No âmbito doméstico, a maioria dos cães com sorologia reagente não apresenta sinais clínicos, atuando, no entanto, como reservatórios e podendo infectar os flebotomíneos (MORENO & ALVAR, 2002; SILVA et al., 2005).

Segundo Dietze et al. (1997), entre os anos de 1990 e 1994, quase cinco milhões de cães foram submetidos a exames sorológicos e mais de 80.000 animais sacrificados no Brasil, entretanto, a doença humana aumentou em quase 100% no mesmo período.

Em Belo Horizonte, durante os anos de 1993 a 2004 foram realizados inquéritos sorológicos para a detecção de cães positivos, como parte das ações do programa de controle desenvolvido pela Secretaria Municipal de Saúde através do Departamento de Controle de Zoonoses. Neste período foram examinados 1.103.407 amostras de sangue canino e 53.262 cães foram identificados como positivos, mostrando prevalência média de 4,86% (PREFEITURA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE, 2005).

A expansão da doença canina, associada aos conhecimentos insuficientes dos elementos que compõem a endemia, levaram as autoridades sanitárias do município a direcionarem o controle desta zoonose para a população canina, amparando-se no inquérito sorológico e na eutanásia dos animais soropositivos (RIBEIRO, 2006).

Costa & Vieira (2001) analisam que o programa de eliminação de cães soropositivos apresenta o menor suporte técnico-científico dentre as demais medidas propostas pelo programa de controle, quer pela falta de correlação espacial entre a incidência de LVH e a soroprevalência canina, quer pela pouca eficiência da medida comparada ao controle do vetor.

Segundo Moreira et al. (2005), somente esta medida não é suficiente para o controle da LVH

e da LVC, mesmo quando são utilizadas técnicas sorológicas mais sensíveis e redução do intervalo entre o diagnóstico e a remoção dos cães soropositivos. Estes autores afirmam, ainda, que é alta a taxa de reposição dos animais seguida ao sacrifício dos cães soropositivos, seja por filhotes susceptíveis ou por outros cães já acometidos pela infecção. Sugerem, também, que estes fatos têm contribuído para a ineficácia das medidas de controle, associados a outros fatores de ordem operacional.

Os principais fatores relacionados ao insucesso das medidas de controle da LV seriam: a falta de padronização dos métodos de diagnóstico da infecção humana e canina; a discordância entre os estudos que avaliam o impacto da eliminação de cães soropositivos na prevalência da infecção humana; a demonstração de que outros reservatórios poderiam ser fontes de infecção de *L. chagasi*, como os canídeos silvestres e os marsupiais; e a escassez de estudos sobre o impacto das ações de controle dirigidas contra os vetores (COSTA & VIEIRA, 2001; GONTIJO & MELO, 2004).

Estudos realizados por Dietze et al. (1997) demonstraram que a eliminação dos cães soropositivos reduziu apenas temporariamente a força de transmissão entre os cães, sendo por isto considerada medida insuficiente para o controle da LVC, segundo publicações que avaliam esta medida no Brasil (ASHFORD et al., 1998). Dye (1996) baseado em artigos publicados sobre o controle da doença e fazendo uso de simulações matemáticas, sugere que o combate ao vetor deveria ser a primeira opção, no que diz respeito a uma estratégia eficiente de controle para a LV no Brasil.

Alguns autores sugerem o uso de vacinas profiláticas, quer seja para uso animal, quer seja para uso humano, como ferramenta para substituir o sacrifício dos cães portadores de *L. chagasi* e diminuir a incidência de LVH (DA SILVA, 2001; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; DYE, 1996; GONTIJO & MELO, 2004).

Outras medidas têm surgido como ferramentas para o controle da LVC, entre elas o uso de coleiras impregnadas com repelentes a base de deltametrina ou formulações tópicas a base de permetrina (NOLI & AUXILIA, 2006). Vários estudos na Europa e no Brasil demonstram que ocorre diminuição na prevalência da LVC quando cães utilizam a coleira ou formulações tópicas, e como consequência, a diminuição da incidência da doença entre os homens (DAVID et al., 2001; FOGLIA MANZILLO et al., 2006, MAROLI et al., 2001; MIRÓ et al., 2006 in press; REITHINGER et al., 2004).

3 – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A inoculação dos parasitos na pele do cão provoca uma resposta inflamatória local, com a adesão e internalização do parasito basicamente por células de Langerhans e outras dendríticas (FERRER, 2002).

Nos animais suscetíveis, nas primeiras horas pós-inoculação ocorre a disseminação do parasito, por via hematogena ou linfática, inicialmente para a pele, linfonodos, baço e medula óssea, seguida do parasitismo do fígado e dos rins e, mais tarde, dos órgãos reprodutivos. Na evolução, os parasitos alcançam a bexiga, sistemas respiratório e digestivo e novamente a pele (ALVAR et al., 2004; CARDOSO & CABRAL, 1999).

Nos órgãos parasitados observa-se uma reação inflamatória, estimulação policlonal de linfócitos B, com grande produção de imunoglobulinas específicas e não específicas, e formação de imunocomplexos, que se depositam em diferentes órgãos (BARBIÉRI, 2006; TAFURI et al., 1986).

A presença do parasito nos órgãos e tecidos, associado à resposta imune do cão ante a infecção determinam reações que produzem as lesões e sinais clínicos característicos da LVC (ALVAR et al. 2004; REIS et al., 2006).

O período de incubação da doença é de difícil determinação, e devem ser levados em conta fatores individuais relacionados à resposta imune do cão. Este período pode variar de três meses até vários anos (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; CARCELÉN et al., 2005; FERRER, 1999; GRIMA, 2005). A relação de fatores como idade, sexo e raça não está ainda bem elucidada com a predisposição do animal para o desenvolvimento da LVC (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; FERRER, 1999; KOUTINAS & SARIDOMICHELAKIS, 2004). É conhecido que cães da raça Ibizaian Hound, embora sejam

encontrados com a infecção em proporção semelhante as demais raças, seriam mais resistentes ao desenvolvimento da doença (ALVAR et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et. al, 2000).

Cerca de 50% a 60% de todos os cães portadores de formas amastigotas não exibem qualquer sinal clínico da doença, e 20% destes animais apresentam parasitos na pele (ALVAR et al., 2004; BANETH, 2006). Alvar et al. (2004) citam que cerca de 15% dos animais infectados são capazes de recuperar dos sinais clínicos e eliminar os parasitos espontaneamente.

As manifestações clínicas da LVC geralmente são classificadas como sendo do tipo visceral ou cutânea, sendo que em alguns casos há sobreposição destas manifestações (AMUSATEGUI et al., 2003; BANETH, 2006).

As anormalidades cutâneas são muito comuns, mas de variável extensão e caracterização. A maioria dos autores afirma que em entre 60% e 90% dos cães infectados apresentam algum tipo de lesão dermatológica (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; BANETH, 2006).

As alterações dermatológicas mais comuns são: dermatites esfoliativa, seborréica, papular, nodular e ulcerativa; pústulas; despigmentação nasal; hiperpigmentação; alopecia em localização e graus variáveis; hiperqueratose; descamação; e onicogribose (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; BANETH, 2006; COSTA-VAL, 2004; FONDATI & FONDEVITA; 2004).

Após as dermatopatias, as linfadenomegalias, quer seja localizada ou generalizada, constituem o achado clínico mais comum em pacientes com LVC (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; FERRER, 2002; LIMA et al., 2004). Os linfonodos mais afetados são: os poplíteos, os pré-escapulares e os submaxilares (BANETH, 2006; LIMA et

al., 2004).

As oftalmopatias ocorrem concomitantemente com outros sinais sistêmicos, mas podem constituir a primeira alteração aparente da doença (PEÑA et al., 2000; SAUQUILLO, 2005). A prevalência das oftalmopatias associadas à LVC varia entre 16% e 80%. Neste contexto, as principais alterações nos olhos e seus anexos são: alopecia periocular, blefarite, conjuntivite e uveíte anterior. Outras oftalmopatias de ocorrência incomum incluem a ceratoconjuntivite seca, catarata, coriorretinite, descolamento de retina e glaucoma (AMUSATEGUI et al., 2003; PEÑA et al., 2000; SAUQUILLO, 2005).

As alterações renais mais comuns são as glomerulonefrites, em consequência de lesões tubulares e glomerulares resultantes da deposição de imunocomplexos (ALVAR et al., 2004; BONFANTI & ZATELLI, 2004; TAFURI et al., 1989). Estas alterações interferem na capacidade funcional normal do órgão, provocando um quadro de proteinúria, que progride para uma síndrome nefrótica ou insuficiência renal crônica (BONFANTI & ZATELLI, 2004; FERRER, 1999).

Os parasitos podem provocar lesões hepáticas, induzindo alterações na morfologia dos hepatócitos e conseqüentemente no metabolismo do órgão (ALVAR, et al, 2004). Costa Val (2004), citando outros autores, relata que as hepatopatias associadas à LV, bem como hepatomegalias são raras em pacientes caninos.

Alterações no baço de cães portadores de LV são bastante variáveis (COSTA VAL, 2004). Os parasitos induzem uma desorganização na estrutura celular do órgão, com a hiperplasia da polpa branca e polpa vermelha do órgão determinando esplenomegalias em graus variados (ALVAR et al., 2004).

A perda de peso e a atrofia da musculatura das fossas temporais estão presentes em boa parte

dos casos de LVC, porém em frequência variável (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; FERRER, 2002). Estes sintomas seriam resultantes de um desequilíbrio protéico, em virtude da proteinúria associada ao quadro de deficiência imunológica crônica do paciente canino (ALVAR et al., 2004; BONFANTI & ZATELLI, 2004).

Cerca de 5% a 10% dos cães com LVC apresentam epistaxe, que pode ser devido a lesões inflamatórias e ulcerativas da mucosa nasal (FERRER, 1999).

Segundo Barbiéri (2006), a infecção sintomática está associada com a crescente produção de anticorpos e imunorregulação negativa da resposta celular com a decrescente produção de interleucina-2, interferon- γ e fator de necrose tumoral- α . Desta forma, animais sensíveis a LV tendem a desenvolver resposta imune predominantemente humoral caracterizada por hipergamaglobulinemia policlonal, ineficiente para a eliminação do parasito.

A resposta humoral específica que se manifesta na LVC é caracterizada pela produção de níveis elevados de IgG anti-*Leishmania*.

Hoje, acredita-se que aqueles cães capazes de desenvolver uma resposta imune predominantemente celular ante a infecção, tendem a controlar a progressão da doença, minimizando ou não apresentando sinais compatíveis com a doença (BARBIERI, 2006; DAY, 2004a; PINELLI et al., 1994).

4 – DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Um diagnóstico acurado de LVC pode ser extremamente difícil, e só deve ser estabelecido após cuidadoso exame físico realizado, e uma combinação de exames parasitológicos, sorológicos e moleculares (ALVAR et al., 2004; FERRER, 1999). O diagnóstico puramente clínico torna-se impossível, primeiro porque mais de 50% dos animais soropositivos para a doença são assintomáticos, e segundo porque os sinais clínicos, quando presentes, podem ser confundidos com outras doenças (GRADONI, 2002).

Os exames parasitológicos são fundamentados na demonstração de formas amastigotas de *Leishmania* em esfregaços de aspirados de medula óssea e linfonodos, e por aposição de fragmentos de pele ou outros tecidos, ou indiretamente pelo isolamento do parasito em meio de cultura, a partir de formas amastigotas presentes nestes materiais (ALVAR et al., 2004; GRADONI, 2002).

Os aspirados de medula óssea e linfonodos são os mais usados pelos clínicos veterinários. A principal desvantagem deste método é a sensibilidade que varia entre 60% a 75% nos aspirados de medula óssea e de 40% a 50% naqueles de linfonodos (ALVAR et al., 2004). O isolamento destes materiais em meio de cultura apropriado para o crescimento de *Leishmania*, é capaz de aumentar a sensibilidade destes testes em cerca de 20%. Estes exames permitem, diante da positividade, o diagnóstico de certeza da infecção (ALVAR et al., 2004).

O exame histopatológico de fragmentos da pele e linfonodos podem ser usados como método de diagnóstico, mas deve-se ter em mente que o infiltrado inflamatório encontrado não é específico de LVC e que apenas o encontro das formas amastigotas fornece o diagnóstico de positividade (COSTA VAL, 2004). As técnicas de imuno-histoquímica podem melhorar os problemas relacionados à evidenciação do parasito, pois anticorpos específicos marcados detectam com maior sensibilidade e especificidade as formas amastigotas nos cortes de

tecidos (TAFURI et al., 2004).

A hipergamglobulinemia apresentada pelos animais permite que técnicas menos invasivas identifiquem o portador de LV.

Dentre os vários testes sorológicos utilizados para o diagnóstico da LVC, destacam-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), que em diferentes estudos demonstra sensibilidade variando de 83% a 100%, e especificidade, dependendo da região geográfica em que o teste é aplicado, entre 74% a 100% (ALMEIDA et al., 2005; DA SILVA et al., 2006) e “Enzyme Linked Imunosorbent Assay” (ELISA), cuja sensibilidade oscila entre 97% a 100% e especificidade de 88% a 100%, quando são usados antígenos brutos (ROSÁRIO et al., 2005).

Para Gradoni (2002) a RIFI é considerado o padrão ouro para o diagnóstico sorológico da LV canina, pois além de ser o teste mais utilizado por pesquisadores europeus nos últimos anos, é também a técnica recomendada pelo “Office International dês Epizooties” (OIE).

A RIFI e o ELISA são as técnicas recomendadas pelo MS para a avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários. O ELISA é ainda recomendado para a triagem de cães sorologicamente negativos, e a RIFI para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste de ELISA ou como uma técnica diagnóstica de rotina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

O diagnóstico molecular realizado sobretudo pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), baseia na amplificação de uma sequência conhecida de oligonucleotídeos específicos do patógeno. Este teste é altamente sensível e específico para *Leishmania*, e apresenta como vantagem sua realização em grande variedade de materiais clínicos, como sangue, aspirados de medula ou linfonodos, biópsias de pele, urina, dentre outros (ALVAR et al., 2002).

4.1 – ALTERAÇÕES EM EXAMES LABORATORAIS

Embora os dados de hematologia, bioquímica sérica e urinálise possuam limitado valor para o diagnóstico da LVC, estes parâmetros fornecem importantes subsídios para avaliação do estado clínico do animal e prognóstico da evolução da doença (COSTA VAL, 2004).

A anemia é um achado freqüente na doença canina, sendo reportada em cerca de 50 a 70% dos pacientes, tendo como características marcantes a normocitose, normocromia e arregeneração (BANETH, 2006; XAVIER, 2002). As principais causas desta alteração no hemograma seriam: perda sanguínea pela epistaxe e ulcerações da pele, eritrólise, inflamação generalizada e insuficiência renal crônica, hipoplasia ou aplasia medulares (COSTA VAL, 2004; DE LUNA et al., 2000; KOUTINAS et al., 1999). Por outro lado, outros autores consideram a anemia como um achado pouco freqüente (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003).

As contagens total e diferencial de leucócitos não obedecem qualquer padrão em cães portadores de LV: alguns animais apresentam leucocitose com desvio a esquerda regenerativo enquanto outros apresentam leucopenia (geralmente por neutropenia), ou mesmo perfil leucocitário normal (AMUSATEGUI et al., 2003; COSTA VAL, 2004).

Segundo a literatura, a trombocitopenia ocorre entre 29% a 50% . Esta alteração, entretanto, pode ou não estar associada a alterações no perfil hemostático do paciente (AMUSATEGUI et al., 2003; COSTA VAL, 2004; XAVIER, 2002).

As alterações na atividade funcional dos rins, representado pelo aumento das concentrações séricas de uréia e creatinina é um achado relativamente comum em cães portadores de LV. Cerca de 45% destes animais apresentam azotemia (AMUSATEGUI et al., 2003). A proteinúria glomerular não seletiva é encontrada na maioria dos cães portadores de LV

(BONFANTI & ZATELLI, 2004; ZATELLI, 2004).

Uma característica marcante da LVC é a disproteinemia sérica, caracterizada, por hipergamaglobulinemia que ocorre na maioria dos cães com LV, podendo alcançar 100 % dos animais infectados (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; BONFANTI & ZATELLI, 2004; FERRER, 1999).

A composição do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas dos cães doentes sofre alterações, principalmente quanto à relação albumina e globulina séricas (A/G). O aumento da concentração no plasma das frações β e γ seria responsável pelo aumento geral das gamaglobulinas; enquanto que a diminuição da albumina seria devido a perdas por nefropatias, doenças hepáticas, subnutrição crônica ou até mesmo a combinação destes fatores (AMUSATEGUI et al., 2003; BONFANTI & ZATELLI, 2004).

Aumentos na atividade das enzimas hepáticas, bem como aumento nos teores de bilirrubinas, não ocorrem com frequência nos cães portadores de LV (AMUSATEGUI et al., 2003).

Em relação à urinálise, a proteinúria é a alteração mais freqüentemente descrita, variando de cerca de 70% a 100% dos animais portadores de LV, seja em graus discretos ou até mesmo graves. Em alguns animais, a proteinúria pode ser tão grave que chega a determinar alterações nos valores de proteínas séricas normais (AMUSATEGUI et al., 2003; BONFANTI & ZATELLI, 2004; COSTA VAL, 2004).

5 – TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Na terapia da LVC são utilizadas as mesmas drogas aplicadas ao tratamento da LVH desde a primeira metade do século 20, variando sua posologia e via de administração (ALVAR et al., 2004).

A tendência atual na terapêutica da LVC é a combinação de mais de um fármaco. Novas formulações têm sido propostas para o uso dos fármacos tradicionais, como o transporte destes em vesículas lipídicas. Por outro lado, há uma busca constante de novas moléculas que sejam eficazes no tratamento da doença no cão. (NIETO et al., 2005).

As principais drogas utilizadas no tratamento da LVC são os antimoniais, o Desoxicolato de Anfotericina B (Anfotericina B) convencional ou encapsulada em lipossomas, o Sulfato de Aminosidina (Aminosidina), o Alopurinol, a Pentamidina e, recentemente, o Éster de fosfatidilcolina do hexadecanol (Miltefosina) (ALVAR et al., 2004; MIRÓ, 2005; NIETO et al., 2005).

Os fármacos de primeira escolha no tratamento da LVC são os antimoniais - o Antimoniato de Meglumina (Antimoniato) e o Stibogluconato de Sódio - largamente utilizados para o tratamento da LVC na Europa e em outras partes do mundo. Eles agem inibindo enzimas do protozoário que são utilizadas na oxidação de ácidos graxos e glicólico. Os protocolos de utilização são muito variados na literatura, entretanto, a aplicação de 100mg/kg de peso por três a quatro semanas e a via subcutânea é a administração mais usual (BANETH & SHAW, 2002; MIRÓ, 2005; NOLI & AUXILIA, 2005).

Mancianti et al. (1988), citado por Ribeiro (2006), demonstraram que o uso do antimonial em cães poderia ser recomendado como forma de controle da doença canina, uma vez que ele preveniu o desenvolvimento da doença em 90% de cães assintomáticos. Ribeiro (2006) relata

que outros autores verificaram em diferentes estudos, que o tratamento da LVC com antimonial resultou em redução da prevalência da doença canina na região estudada.

Alvar et al. (1994), utilizando antimonial e Alopurinol no tratamento de cães, em períodos reduzidos, verificaram que além da melhora clínica, os animais se mantiveram não infectantes para os flebotomíneos por pelo menos quatro meses após o tratamento. Os autores levantam a hipótese de se tratar os cães infectados durante a estação de transmissão da doença na Europa, como forma de controle da transmissão.

Miró (2005) avaliou por xenodiagnóstico a capacidade infectante de cães tratados com Antimoniato de Meglumina e mantidos com Alopurinol. Seis meses após o término das aplicações do Antimoniato de Meglumina, 85% destes animais apresentaram xenodiagnóstico negativo.

Em recente estudo, João et al. (2006) demonstraram, em cães tratados com Antimoniato sozinho, ou em combinação com Alopurinol, que ocorreu melhora no quadro clínico e a redução ou eliminação completa dos parasitos da pele, concluindo que este protocolo seria capaz de diminuir a infecciosidade aos flebotomíneos e como consequência a transmissão do parasito.

Novas formulações na base de Antimoniato de Meglumina encapsulado em lipossomas têm sido testadas em cães, para verificação de sua eficácia terapêutica, e podem vir a se constituir em ferramenta útil no tratamento tanto da LVC quanto da LVH (COSTA VAL, 2004; VALLADARES et al., 2001; SCHETTINI et al., 2005).

A alta toxicidade atribuída aos antimoniais parece não ser importante no tratamento canino, pois os poucos efeitos adversos, quando produzidos, são normalmente reversíveis e em raras ocasiões é recomendada a suspensão do tratamento. Os principais efeitos adversos são:

mialgias e artralgias, diarreias, vômitos, náuseas, dor abdominal, anorexia. Podem ocorrer dor no local da injeção, abscessos e fibrose (NIETO et al., 2005).

No Brasil, desde fevereiro de 2004, o Antimoniato de Meglumina (*Glucantime*[®], Rhône Mérieux, Lyon, França) tem sua distribuição e uso restrito ao serviço público de saúde, destinado ao tratamento humano, não podendo ser utilizado em nenhuma condição para o tratamento da LVC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A Anfotericina B (*Fungizone*[®], Bristol-Myers Squibb, EUA) considerada fármaco de segunda linha para o tratamento da LVC, é um antibiótico da classe dos polienos produzido a partir do *Streptomyces nodosus*. É primariamente uma droga fungicida, que possui atividade contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Leishmania* spp. (BANETH, 2006; LEMKE et al., 2005).

O mecanismo de ação da Anfotericina B está baseado na ligação do fármaco ao ergosterol da membrana celular da *Leishmania*. Nos mamíferos, a Anfotericina B se liga ao colesterol da membrana celular, o que parece estar relacionado aos efeitos adversos do fármaco nestes. A ligação ao ergosterol provoca uma desorganização estrutural na membrana, formando poros que alteram sua permeabilidade ao potássio intracelular, acarretando em morte do parasito por lise osmótica (BANETH, 2006; LEMKE et al., 2005; NIETO et al., 2005).

Os protocolos terapêuticos para o uso de Anfotericina B em LVC, mesmo sendo mais homogêneos em relação a dose do que aqueles que utilizam os antimoniais, ainda diferem entre os autores (NIETO et al., 2005).

Alguns autores sugerem que o protocolo mais recomendado para a Anfotericina B em cães, seria uma dose acumulada de 8-26 mg/kg, por via subcutânea ou endovenosa, em doses de 0,5mg/kg duas a três vezes por semana (ALVAR et al., 2004; BANETH, 2006; BANETH &

SHAW, 2002).

Os principais efeitos colaterais associados ao uso da Anfotericina B se classificam em dois principais grupos: aqueles relacionados a infusão e os relacionados a dose e ao tempo de uso (NIETO et al., 2005).

Os efeitos adversos devido à infusão estão associados também à velocidade com que o fármaco é infundido no paciente canino. Geralmente ocorrem tremores, febre, náuseas, vômitos, anorexia, mialgias, artralgias, e perda de peso. A toxicidade da Anfotericina B está relacionada com a dose e a forma de administração, sendo que é mais grave quando o fármaco é administrado em forma de *bolus* e em pequenos volumes (NIETO et al., 2005).

A nefrotoxicidade é a principal expressão tóxica da Anfotericina B. Durante o tratamento da LVC, o fármaco provoca a diminuição da taxa de filtração glomerular, aumento dos níveis séricos de uréia e creatinina, e diminuição do *clearance* de creatinina. Também ocorre diminuição na osmolaridade da urina (NIETO et al., 2005).

A eficácia do uso da Anfotericina B no tratamento da LVC a partir de diferentes formulações tem sido pouco investigada. Há referências sobre o uso da formulação padrão de Anfotericina B diluída em água, em solução intralipídica a base de óleo de soja; ou ainda a formulação de Anfotericina B encapsulada em lipossomas (NOLI & AUXILIA, 2005).

Lamothe (2001) utilizou Anfotericina B associada a uma formulação lipídica de nutrição parenteral (*Intralipid*[®] 10%, Pharmacia & Upjohn Co., USA) para tratar 19 cães acometidos por LV. A solução administrada aos cães era uma emulsão constituída de 50mg de Anfotericina B diluída em 40ml de água para injeção e 10ml de solução intralipídica. Antes de receberem esta emulsão, os pacientes eram infundidos com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (50ml/kg) seguido de solução de manitol 20% (10ml/kg). A dose da emulsão

foi de 1,0mg a 2,5mg/kg por aplicação, totalizando duas por semana, num mínimo de oito aplicações, ou pelo menos 10mg/kg de dose total. Ao final do experimento, todos os cães foram considerados clinicamente curados, e foi obtido resultado negativo na PCR de aspirado de medula óssea de 14 entre 17 destes animais.

Cortadellas et al. (2003), utilizando em 16 cães com LV em protocolo semelhante ao descrito por Lamothe (2001), obtiveram 100% de cura clínica dos pacientes. Todos os animais apresentaram esfregaços de aspirados de medula óssea com resultados negativos e dois destes animais apresentaram PCR positiva deste material cinco meses após o tratamento. Quatro animais apresentaram PCR positiva de aspirados de medula óssea pelo menos uma vez em 18 meses de avaliação. Outros quatro cães apresentaram PCR negativa por três vezes neste mesmo intervalo de avaliação. Os autores observaram ainda que 81% dos animais tratados apresentaram efeitos adversos transitórios durante o tratamento. Estes concluem que embora o tratamento seja inicialmente eficaz, recaídas podem ocorrer após a suspensão do tratamento.

Em um estudo envolvendo 15 cães acometidos por LV, Lamothe (1999) utilizou uma solução composta de 50mg de Anfotericina B diluídos em 40ml de água destilada para injeção, e misturado com 10ml da solução de Intralipid® 10%, em doses de até 2mg/kg por aplicação. O autor obteve a cura clínica de 14 animais. Destes, nove foram submetidos à técnica da PCR em aspirados de medula óssea até três meses após o tratamento, com resultado negativo em sete amostras.

Oliva et al. (1995) avaliaram diferentes protocolos terapêuticos utilizando a Anfotericina B encapsulada em lipossomas (*AmBisome*®, Gilead Sciences, Inc., USA) para o tratamento da LV em 13 cães naturalmente infectados. Os animais receberam uma dosagem entre 3,0mg e 3,3mg/kg por aplicação, em até cinco aplicações. Em todos os cães observaram a cura clínica, entretanto, não ocorreu a cura parasitológica em 12 destes animais. O cão que apresentou cura

parasitológica foi o único tratado com dosagem superior a 15mg/kg.

Nieto et al. (2005), recomendam o uso de Anfotericina B na dose de 0,1mg a 1,0mg/kg/dia em solução de dextrose a 5%, em infusão endovenosa lenta e em quantidades crescentes do fármaco a cada aplicação. Outra via de administração sugerida pelo autor é a subcutânea, com doses entre 0,5mg a 0,8mg/kg/dia. Em ambas as situações, é recomendado uma dose acumulada ao final do tratamento de 15mg/kg, para que este seja efetivo.

Petit et al. (1999), avaliaram a eficácia terapêutica de Anfotericina B aquecida contra *Leishmania donovani*, utilizando o modelo murino. Os autores concluíram que este procedimento diminui a toxicidade e aumenta a atividade do fármaco para o protozoário. Lamothe (2002), baseado neste estudo, utilizou Anfotericina B aquecida durante 15 minutos a 80°C antes da administração em 15 cães acometidos por LV. Onze de doze animais apresentaram resultado negativo na PCR de aspirado de medula óssea. O autor sugere que o uso deste protocolo terapêutico pode ser eficaz no tratamento da LVC.

Lamothe (1999), propõe o uso de Anfotericina B administrada em infusão rápida (entre 15 a 45 segundos), na dose entre 0,5mg e 0,8mg/kg, de duas a três vezes na semana, até a dose acumulada de 8mg a 15mg. De 30 cães tratados segundo este protocolo, 28 obtiveram cura clínica, e 27 dos animais não apresentaram recaídas da doença após um ano, mesmo sem o uso de medicamentos para manutenção, como o Alopurinol.

Em um estudo retrospectivo, 41 cães portadores de LV foram submetidos a dois protocolos terapêuticos diferentes com Anfotericina B, e mantidos em uso constante com Alopurinol. O primeiro grupo de 20 animais foi tratado com Anfotericina B diluída em solução de Intralipid® 10%, conforme protocolo descrito por Lamothe (1999) e Cortadellas (2003). No segundo protocolo, 21 cães foram tratados com 0,9mg/kg a 2,5mg/kg, em doses crescentes, duas vezes por semana de Anfotericina B dissolvido em 10ml de água para injeção, e mantido

por 15 minutos em banho-maria a 80°C antes da administração. Em ambos os protocolos, os animais receberam em uso constante 20mg/kg/dia de Alopurinol. Após dois anos de acompanhamento, 85% destes animais foram considerados clinicamente curados. Outra conclusão do autor é que o uso constante do Alopurinol como terapia de manutenção, pode prevenir as recaídas pós-tratamento da LVC (LAMOTHE, 2004).

Em qualquer protocolo que utilize a Anfotericina B no tratamento da LVC, o paciente deve ser acompanhado de uma cuidadosa monitoração de sua função renal. A diminuição da nefrotoxicidade da droga tem sido conseguida com o advento das formulações lipossomais, que podem ser administradas em doses mais elevadas (3mg/kg) e um intervalo de tempo mais longo entre as aplicações (ALVAR et al., 2004; BANETH, 2006; BANETH & SHAW, 2002; NIETO et al., 2005).

A Aminosidina é um antibiótico aminoglicosídeo produzido por *Streptomyces rimosus*, que tem sido usado para o tratamento de leishmaniose em humanos na África e Europa (BANETH & SHAW, 2002). Sua atividade anti-*Leishmania* foi testada em modelos experimentais animais e contra várias espécies de *Leishmania in vitro* (POLI et al., 1997). O mecanismo de ação é baseado no bloqueio da ligação do RNA a unidade 30S dos ribossomas, o que acarreta alteração na síntese protéica do parasito (NOLI & AUXILIA, 2005).

Poli et al. (1997) em um estudo comparativo, mostram que esta droga possui eficácia similar aos antimoniais no tratamento da LVC. Por outro lado, Vexenat et al. (1998), citam que o tratamento da LVC com esta droga não deve ser usado como auxiliar no controle da LVH, devido ao baixo índice de cura parasitológica nos cães. Estes autores afirmam que embora a droga apresente eficácia para a melhora no quadro clínico, os animais tratados poderiam ainda funcionar como reservatório para a infecção humana.

A recuperação clínica dos cães tratados com a Aminosidina está entre 33% e 100%,

dependendo do protocolo utilizado (NOLI & AUXILIA, 2005). O protocolo terapêutico é baseado na administração de 10-20mg/kg por dia, durante 14-30 dias, pelas vias subcutânea ou intramuscular profunda (BANETH & SHAW, 2002). A ototoxicidade e a nefrotoxicidade são os principais efeitos colaterais relatados (NOLI & AUXILIA, 2005).

O Alopurinol é uma droga da classe das hipoxantinas, que metabolizada pela *Leishmania* produz um análogo inativo da inosina. Este análogo é incorporado no RNA do parasito, causando síntese protéica errônea. O Alopurinol é largamente usado na terapia de LVC, sozinho ou em combinação com outras drogas, devido a sua baixa toxicidade, sua eficiência em proporcionar significativa remissão dos sinais clínicos, baixo custo e conveniência de ser administrado por via oral. É administrado na posologia de 15-30mg/kg, duas vezes ao dia, por todo o período de manutenção do tratamento (BANETH & SHAW, 2002).

Kuotinas et al. (2001) e Vercammen et al. (2002) avaliando diferentes protocolos de tratamento para LVC com Alopurinol concluem que, mesmo quando usado sozinho, este fármaco induz gradual remissão dos sinais clínicos, recuperação das anormalidades clínico patológicas e diminuição do nível de anticorpos específicos circulantes. Os mesmos autores afirmam que a despeito da melhora clínica, o fármaco não consegue promover a cura parasitológica na maioria dos casos, ainda que ocorra considerável diminuição da carga parasitária dos cães tratados.

A Miltefosina atua no metabolismo de lipídeos, com atividade sobre a membrana de *Leishmania*, e acumula-se em macrófagos, sendo diretamente tóxica para o parasito. Este composto induz *in vitro* a ativação de macrófagos e células T, que produzem interferon gama, citocina associada ao controle da infecção. Este fármaco é efetivo para o tratamento de humanos e de animais experimentais (BANETH & SHAW, 2002; NIETO et al., 2005).

Recente pesquisa avaliou a eficácia da Miltefosina no tratamento de cães naturalmente

infectados por *L. infantum* na França e Espanha. A droga foi administrada na dose de 2mg/kg, uma vez ao dia, por via oral, durante 28 dias. Os autores concluíram que esta droga demonstrou, em resultados preliminares, maior eficácia e segurança, além de poucos efeitos colaterais, quando comparada ao tratamento com Antimoniato de Meglumina. A cura parasitológica neste estudo foi de 93,9%. A facilidade de administração e a eficácia da Miltefosina demonstradas neste estudo indicam que esta é uma droga promissora para o tratamento da LVC. Os principais efeitos colaterais relacionados com o uso da Miltefosina são distúrbios gastrointestinais transitórios, sendo recomendado sua administração junto a ingestão de alimentos (MIRÓ et al., 2005; NIETO et al., 2005).

A Pentamidina é uma diamidina aromática usada para o tratamento de babesiose, tripanossomíase, bem como leishmaniose. O protocolo de tratamento indica oito injeções de Pentamidina a 4mg/kg, por via intramuscular, a cada três dias. Os principais efeitos colaterais são: dor no local da aplicação, hipotensão, taquicardia e vômitos (ALVAR et al., 2004; BANETH & SHAW, 2002).

Os azóis, como Cetoconazol, Fluconazol, Miconazol, são drogas investigadas para atividade anti-*Leishmania*, demonstrando, porém, baixa efetividade. Estas drogas necessitam de mais estudos, mas podem ser candidatas a manutenção no tratamento da LVC (LAMOTHE, 1999; NIETO et al., 2005).

Noli & Auxilia (2005) relatam um estudo em que sete cães portadores de LVC foram submetidos a injeções, por via intramuscular, de Buparvaquona (5mg/kg), uma droga usada no tratamento da teileriose. Os cães apresentaram nenhuma ou apenas melhora parcial dos sinais da doença.

Bianciardi et al. (2004) testaram a eficácia do uso de Enrofloxacin, uma droga da classe das fluorquinolonas, no tratamento da LVC. Os autores sugerem que o fármaco *in vitro* não

possui atividade direta contra o parasito, mas que é capaz de induzir um aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos. *In vivo*, demonstram que ocorre uma melhora no quadro clínico dos cães tratados, principalmente nas lesões de pele. Sugerem então, que este fármaco apresenta neste caso, atividade imunomoduladora e poderia ser associado a uma droga leishmanicida como um novo protocolo de tratamento para LVC.

Recentemente, Vouldoukis et al. (2006) avaliou a eficácia *in vitro* da Marbofloxacina, uma fluoquinolona de terceira geração, contra formas promastigotas de *L. infantum*. Os autores sugerem que este fármaco pode vir a se tornar uma alternativa promissora no tratamento da LVC quando associado a outras drogas leishmanicidas, por ser relativamente barato, de baixa toxicidade e administrado por via oral.

Outra linha de pesquisa para o tratamento da LVC é a imunoterapia. Borja-Cabrera et al. (2004), submeteram 26 cães a imunoterapia com a vacina fucose-manose ligante e sugerem, a partir dos dados obtidos, que este método seria eficaz no tratamento da LVC.

O tratamento da LVC vem sendo motivo de discussão há muitos anos, seja pela comunidade científica, seja pela sociedade de uma forma geral considerando que inicialmente, para todos os cães com diagnóstico sorológico positivo a única recomendação era a eutanásia. Atualmente, tem se observado mudança gradual em relação a esta atitude, com um número cada vez maior de cães sendo submetidos ao tratamento. Os motivos que conduziram a esta mudança de conduta são vários, como por exemplo: questões sociais, científicas, sentimentais, além do acesso à informação, pelos proprietários, e a técnicas diagnósticas que permitem a detecção precoce dos animais infectados, o que possibilita a estes animais lograr maior êxito terapêutico (GRIMA, 2005).

A opção pelo tratamento de um cão deve considerar parâmetros ligados à condição clínica do paciente e a participação consciente do proprietário, que somados irão determinar os critérios

de tratamento e sua viabilidade (MIRÓ, 2005).

O médico veterinário só deve iniciar o tratamento após a avaliação clínica, e de posse de detalhado perfil laboratorial do paciente, que inclui confirmação do diagnóstico sorológico e determinação do título final de positividade da RIFI, necessário ao acompanhamento da resposta ao tratamento; da presença do parasito em amostras de pele, ou de linfonodos, ou de medula óssea; hemograma completo, do perfil renal, hepático e eletroforético das proteínas séricas; além da identificação e tratamento prévio de infecções concomitantes (MIRÓ, 2005; NIETO et al., 2005; RIBEIRO & MICHALICK, 2001).

O significado do termo “tratamento bem sucedido” para a LVC é dependente da ótica dos autores envolvidos com o diagnóstico e tratamento da LVC. Para o proprietário e para o clínico veterinário, o sucesso do tratamento se dá a partir da remissão dos sinais e melhoria da condição clínica apresentada pelo animal. Para os parasitologistas, a cura significa completa eliminação do parasito do hospedeiro, enquanto que para os entomologistas, órgãos de saúde pública e epidemiologistas, a incapacidade do animal em transmitir o parasito aos insetos vetores (quebrando o ciclo de transmissão) é suficiente para considerar o tratamento como um sucesso (BANETH & SHAW, 2002).

Alguns autores sugerem que os cães tratados para LV que permanecem assintomáticos pós-tratamento apresentam menor quantidade de parasitos na pele do que aqueles sintomáticos, sejam estes tratados ou não. Sugerem também que o tratamento para LVC poderia ser considerado como uma medida profilática no controle da doença (ALVAR, 1994; JOÃO et al., 2006; MIRÓ et al., 2005; RIBEIRO, 2006).

Miró (2005) acredita que, sempre que possível, todos os cães com LV devem ser tratados, tendo em vista a diminuição da carga parasitária e da infecciosidade aos flebotomíneos obtidas pelo tratamento, o que refletiria positivamente na epidemiologia da doença canina

humana.

OBJETIVOS

6 – OBJETIVOS

6.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros clínicos, sorológicos e parasitológicos, de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L) chagasi*, tratados com protocolo envolvendo Anfotericina B e Alopurinol, e mantidos em domicílio, no período de janeiro de 2004 e dezembro de 2005.

6.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Selecionar, na cidade de Belo Horizonte, uma clínica veterinária dentre três, com cães tratados com Anfotericina B e mantidos com Alopurinol, no período entre janeiro de 2004 e dezembro de 2005;
- ✓ Correlacionar a condição clínica destes cães com os resultados dos exames laboratoriais realizados no momento da avaliação e antes do início do tratamento;
- ✓ Avaliar a presença de parasitos pela imuno-histoquímica e PCR , realizadas a partir de biópsia pele de orelha, antes do tratamento e no momento da avaliação.

MATERIAL E MÉTODOS

7 – MATERIAL E MÉTODOS

7.1 – SELEÇÃO DA CLÍNICA VETERINÁRIA

Este projeto foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO A).

A partir do banco de dados do Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, foi selecionado o período entre janeiro de 2004 e dezembro de 2005 para o levantamento de todos os exames processados e identificação das clínicas solicitantes. Foram identificados os casos soropositivos, considerando o resultado positivo no teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI) na diluição igual ou superior de 1:40. Este resultado foi cruzado com o solicitante do exame e o nome e endereço do cão, para se obter o número de animais soropositivos atendidos por cada uma das clínicas. A seguir, selecionados os animais que, após o primeiro teste positivo na RIFI, tiveram este exame repetido até a diluição reativa final, identificados como aqueles encaminhados ao tratamento para LVC.

As três entre as maiores Clínicas Veterinárias de Belo Horizonte, que realizavam os exames para o diagnóstico da leishmaniose visceral no Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, foram então consultadas para a parceria neste projeto e aceitaram a participação.

Foi então selecionada a clínica com maior número de pacientes submetidos ao tratamento.

7.2 – SELEÇÃO DA AMOSTRA

Através do acesso ao banco de dados da clínica veterinária selecionada, foi realizado o levantamento dos atendimentos no período estabelecido e selecionados os prontuários de atendimento dos animais identificados pelo Laboratório de Sorologia do Departamento de

Parasitologia do ICB-UFMG.

Todos os dados destes prontuários foram consultados e então selecionados os animais que participaram deste estudo.

7.2.1 – CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo todos os animais atendidos pela clínica veterinária selecionada, de ambos os sexos, independentemente da raça e da idade, que foram submetidos ao protocolo de tratamento para LVC com Anfotericina B na dose de 0,5-3,0 mg/kg (dose acumulada total de 8-25 mg/animal), e que são mantidos em uso constante de Alopurinol, na dose de 10-30 mg/kg a cada 12 horas.

7.2.2 – ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS

Foram recolhidas dos prontuários informações sobre a condição clínica; os resultados dos exames parasitológicos diretos, como esfregaços de aspirado de linfonodos ou medula óssea, e imuno-histoquímica de fragmento da face interna da orelha do cão, obtida a partir de biópsia; o perfil sorológico, que consistiu na diluição reativa final da RIFI e resultado de teste de ELISA; e aos exames laboratoriais, como hemograma completo e o perfil renal do paciente, a partir de dosagens de uréia e creatinina séricas, e do perfil eletroforético de proteínas séricas.

Estes dados foram selecionados de forma temporal considerando o estado clínico e laboratorial dos animais no momento que precedeu ao tratamento, chamado de ANTES DO TRATAMENTO.

No período entre a primeira e a última administração de Anfotericina B, denominado TRATAMENTO, foram analisados: o protocolo terapêutico estabelecido, os exames

laboratoriais realizados e a ocorrência e tratamento de quaisquer patologias concomitantes ao processo, como por exemplo: presença de insuficiência renal aguda, lesões cutâneas ou parasitoses intestinais.

O período após a última administração da droga até o momento da intervenção para a realização dos exames necessários para a conclusão deste projeto foi denominado **MANUTENÇÃO AO TRATAMENTO**. Nesta fase foram avaliados o acompanhamento do paciente, através das consultas e frequência de exames realizados especificamente com o objetivo de controle do tratamento da LVC. Foram considerados ainda, os demais retornos à clínica veterinária, e a observação de quaisquer ocorrências nestas consultas e tratamentos empregados nestes casos como, por exemplo, cirurgias e internações.

7.2.3 – ANUÊNCIA DO PROPRIETÁRIO

Para a avaliação clínica e laboratorial dos animais, foi agendada uma entrevista com o proprietário de cada cão selecionado. Nesta entrevista os proprietários foram informados dos objetivos do projeto, e foi solicitada sua concordância para a utilização dos dados dos exames laboratoriais, registros fotográficos e exame clínico do seu cão. Esta autorização foi obtida com a assinatura de um termo de anuência pelo proprietário (ANEXO B).

7.2.4 – AVALIAÇÃO CLÍNICO LABORATORIAL DOS PACIENTES

Os exames físicos e laboratoriais nos cães foram realizados em consulta agendada pela clínica veterinária parceira do projeto, de acordo com a rotina de retornos pré-estabelecida para reavaliação do tratamento de LVC. O exame clínico e a coleta de amostras foram realizados nas suas dependências, quando foi preenchida uma ficha clínica geral, adaptada de Dunn (2001), e uma ficha para a avaliação e registro dos sinais clínicos mais comuns em cães com LVC, elaborada a partir de Alvar et al. (2004) e Amusatogui et al. (2003) (ANEXO C). Cada

ção foi identificado por um número, registrado no prontuário de avaliação. Neste trabalho, os cães participantes serão referidos por tal número. No momento da avaliação foi realizado o registro fotográfico do animal e dos procedimentos.

7.2.5 – COLETA E PREPARAÇÃO DE MATERIAL PARA ANÁLISE LABORATORIAL

Para a realização dos exames laboratoriais foi utilizada uma amostra de 10ml de sangue, obtido através de venopunção, na veia jugular, realizada com o uso de seringas estéreis (*BD Pastipak*[®], BD Lab., EUA). Este volume foi imediatamente fracionado da seguinte forma: uma alíquota de três mililitros em um tubo sem anticoagulante, para a realização dos exames sorológicos; uma alíquota de três mililitros em um tubo contendo anticoagulante EDTA (*Vaccuntainer*[®], BD Lab., EUA), para a realização de hemograma; uma alíquota de três mililitros do sangue em um tubo sem anticoagulante, para a realização das provas bioquímicas; e um mililitro para papel de filtro (*FTA*[®] *CLASSIC CARD*, Whatman, EUA), para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Após a coleta de sangue, os animais foram contidos manualmente e quando necessário sedados com acepromazina a 1% (*Acepran*[®], UNIVET, Brasil) na dose de 0,22mg/kg por via intramuscular para a realização da biópsia de pele de orelha.

A biópsia de pele foi realizada em todos os animais após prévia aplicação de um volume correspondente à dose de 4mg/kg, por via subcutânea, de Cloridrato de Lidocaína (*Cloridrato de Lidocaína 2%*, Hipolabor, Brasil), como anestésico local, na face interna de uma das orelhas. Procedeu-se então a retirada de um fragmento da pele com o auxílio de um “punch” de cinco milímetros de diâmetro (*Punch para Biópsia*[®], Kolplast ci LTDA, Brasil). O fragmento foi secado em papel de filtro para a retirada do excesso de sangue, e fixado imediatamente em solução de formalina tamponada a 10%.

7.2.6 – EXAMES SOROLÓGICOS

O sangue reservado para a realização dos exames sorológicos foi submetido ao processo de centrifugação a 1500g (*Centrífuga Excelsa Baby II*, FANEM, Brasil) durante 10 minutos, para a obtenção do soro. Este soro foi processado para realização dos testes de RIFI e ELISA.

7.2.6.1 – REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

A RIFI foi realizada baseada na técnica descrita por Camargo (1964), com modificações.

Para a obtenção do título desejado, os soros a serem testados foram diluídos na razão dois, a partir de 1:40, em solução tampão fosfato (PBS) constituída de 850mg de NaCl (Merck, Alemanha), 132mg de NaHPO₄ (Merck, Alemanha), 15,6mg de NaH₂PO₄.H₂O (Merck, Alemanha), dissolvidos em 100ml de água destilada, com pH ajustado para 7.4. Foram colocados 25µl da solução obtida sobre cada região demarcada de uma lâmina, na qual foi previamente fixado o antígeno, constituído por formas íntegras de promastigotas de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR/1967/BH46, rotineiramente utilizada pelo Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB. Após a incubação das lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa a 37°C, estas foram lavadas com PBS, cobertas com o tampão por cinco minutos, lavadas em água destilada e secadas sob ventilação artificial (*Ventilador Britânia B20*, Brasil), e a cada região demarcada da lâmina foi acrescentado 25µl do conjugado diluído a seu título em PBS com Tween 2% (v/v) (*Tween*[®] 20, Merck, Alemanha), acrescido de Azul de Evans 1% (*EVANS BLUE*[®], Sigma Aldrich, EUA). O conjugado, constituído por anti IgG de cão, marcado com Isotiocianato de Fluoresceína (Bethyl Lab. Inc., EUA) foi diluído na proporção de 1:1500. Seguiram-se nova incubação, lavagem e secagem. A lâmina foi, então, coberta com glicerina tamponada e lamínula, e a leitura procedida em microscópio de luz ultravioleta (*Olympus BX 41*[®], Japão). Soros conhecidamente positivos e negativos foram usados na mesma lâmina como controle da reação.

7.2.6.2 – ELISA

O ELISA foi realizado segundo técnica descrita por Voller et al. (1976), com modificações. Os antígenos utilizados foram produzidos a partir de formas promastigotas de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR/1967/BH46, após ruptura por ultra-som a 40 ω (*BRANSON 1510*[®], Branson Ultrasonics Co., EUA) e centrifugação a 1360g (*Centrifuga Excelsa Baby II*[®], FANEM, Brasil) por 10 minutos. Foi dosada a quantidade de proteína através do método de Lowry (LOWRY et al. 1951), e ajustada para 20 μ g por mililitro em PBS e armazenado em freezer à -20°C em alíquotas, até o momento de uso. Foi utilizado como conjugado antiimunoglobulina de cão IgG, marcada com Peroxidase VI (*Bethyl Lab. Inc.*, EUA) na diluição 1:2000. O bloqueio dos sítios inespecíficos presentes na microplaca foi realizado com adição de solução de PBS-Caseína 2% (Calbiochem, Alemanha) por 30 minutos. Foram utilizadas microplacas de polietileno (*Falcon*[®], BD Lab., EUA) de 96 orifícios e fundo plano. Cada orifício foi sensibilizado com 2 μ g de antígeno, diluídos em 100 μ l de tampão carbonato, constituído de 159mg de Na₂CO₃ (Merck, Alemanha) e 293mg de NaHCO₃ (Merck, Alemanha), diluídos em 100ml de água destilada, durante um período mínimo de 24 horas. Para a realização do teste, o excesso de antígeno foi retirado da placa pela lavagem de cada orifício por cinco vezes, com solução de lavagem contendo 0,9% (p/v) de cloreto de sódio e 0,05% (v/v) de Tween 20[®]. A solução para bloqueio de sítios inespecíficos contendo 2% (p/v) de caseína (Sigma Aldrich, EUA) em PBS foi adicionada na ordem de 150 μ l por orifício, seguida de incubação por 30 minutos a 37°C. O excesso de solução de bloqueio foi retirado por duas lavagens sucessivas, com a solução de lavagem. Os soros a serem testados foram diluídos em tampão de incubação contendo 0,05% (v/v) de Tween 20[®] e 0,25% de caseína (p/v). Foi aplicado 100 μ l da solução diluída em cada orifício, sendo utilizado, para isso, a diluição 1:400. A seguir, o material foi incubado por 45 minutos a 37°C e a retirada de excesso do soro diluído foi efetuada por uma série de cinco lavagens, com a solução de lavagem. Um volume de 100 μ l de conjugado

diluído a seu título foi acrescentado a cada orifício. Após nova incubação por 45 minutos a 37°C, o excesso de conjugado foi eliminado por nova série de cinco lavagens. Em seguida, 100µl de solução de OPD (Sigma Aldrich, EUA) foi adicionada aos orifícios. A reação ocorreu à 37°C, no escuro, durante 10 minutos, e foi interrompida por adição de 25µl de H₂SO₄ 4N (Merck, Alemanha) em cada orifício. Em qualquer etapa, após as lavagens, as placas foram secadas por inversão sobre papel absorvente. A leitura foi efetuada em leitor de ELISA (*Bio-Rad 2550*[®], EUA), a 495nm. O ponto de corte ou “cut off” correspondeu à média de absorbância de oito amostras de soro de cães negativos para *L. chagasi*, mais três desvios padrões, testados em cada placa.

7.2.7 – HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

A partir da amostra coletada em tubo com anticoagulante, foi processada a análise do eritrograma completo, contagem total de plaquetas e leucograma (*ABCvet*[®], ABX, France). O estudo da morfologia das hemácias, plaquetas e contagem diferencial de leucócitos foi realizado em esfregaço por extensão da amostra. O sangue contido no frasco sem anticoagulante foi utilizado para a realização das provas bioquímicas, através do método de espectrofotometria convencional (*Celm*[®], Brasil), para as dosagens de uréia, creatinina e proteínas séricas. Estes procedimentos foram realizados no mesmo laboratório de análises clínicas que processou os exames realizados nas fases de pré-tratamento e de manutenção.

7.2.8 – IMUNO-HISTOQUÍMICA

O fragmento obtido a partir da biópsia foi encaminhado ao laboratório de Neuroimunopatologia Experimental (NIPE) do Departamento de Patologia do ICB-UFMG para realização da técnica de imuno-histoquímica de acordo com Tafuri et al. (2004), com modificações, cujos procedimentos básicos são citados brevemente a seguir: os fragmentos fixados foram emblocados em parafina, processados cortes em micrótomos e as lâminas

montadas. As lâminas foram então desparafinadas pela adição de xilol (Merck, Alemanha) por 20 minutos. Fez-se a hidratação das lâminas preparadas a partir dos cortes do fragmento pela adição de álcoois decrescentes (absoluto, 90°, 80°, e 70° respectivamente) e um banho com solução de PBS a 10%; o bloqueio da peroxidase endógena com adição de peróxido de hidrogênio 30 volumes (Synth, Brasil) a 4% por 30 minutos; o bloqueio de reações inespecíficas com solução de bloqueio (12g de leite em pó desnatado diluído em 200ml de PBS) e incubados em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente; adição de soro de cão infectado com *L. chagasi* (1:100) ao fragmento e incubação por 24 horas em câmara úmida a 4 °C; a seguir adicionou-se o anticorpo biotinilado (anti-soro de coelho biotinilado anti-camundongo), na diluição de 1:100 (Dakocytomation Inc., EUA) e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente; adição de estreptoavidina-peroxidase (Dakocytomation Inc., EUA) e incubação em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente, seguida por lavagem com salina tamponada; revelação da peroxidase com diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio por cinco minutos a temperatura ambiente; lavagem e coloração com hematoxilina de Harris (Merck, Alemanha) por três segundos; desidratação em álcoois crescentes (70°, 80°, 90° e absoluto), diafanização em xilol e montagem em bálsamo do Canadá (*Entellan*®, Merck, Alemanha). A leitura foi realizada em microscópio óptico para a identificação da reação que corresponde à presença de formas amastigotas de *Leishmania*. Os resultados foram categorizados em negativo e positivo, sendo que os positivos foram classificados como: parasitismo discreto (+), moderado (++), e intenso (+++), segundo Solano-Gallego et al. (2004), com modificações.

7.2.9 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A extração do DNA das amostras dos fragmentos de pele incluídos em parafina foi realizada utilizando o “*DNA ISOLATION KIT*®” (Gentra, EUA) seguindo instruções do fabricante com algumas modificações. Os fragmentos foram cortados, em capela de fluxo laminar

previamente descontaminada pela ação da luz ultravioleta, com auxílio de uma lâmina de barbear inoxidável estéril – uma lâmina para cada bloco de parafina. Com um dos lados da lâmina foram retirados e descartados fragmentos da superfície do bloco, a fim de evitar contaminações. Com o outro lado cortante da lâmina foram retirados fragmentos do material a ser utilizado para extração. Após a remoção do excesso de parafina com auxílio da lâmina de barbear, cerca de 10mg de tecido foram colocados em tubo de microcentrifuga de 1,5ml, onde foram triturados com pistilos de polietileno estéreis (*Cienceware*[®], Bel-Art Products, EUA) moldados para os tubos. Os fragmentos triturados foram desparafinados com adição de 300µl de xilol (Merck, Alemanha) em cada tubo. As amostras foram então homogeneizadas por cinco minutos à temperatura ambiente, em movimentos constantes com auxílio de um homogeneizador automático (*Lab Rotator*[®], Ames Co.,EUA). A seguir as amostras foram centrifugadas a 13.000g por três minutos, para descarte do xilol. Este processo foi repetido por mais duas vezes, totalizando três banhos com xilol. As amostras foram submetidas a mais duas lavagens com 300µl de etanol 100% (Merck, Alemanha), em movimentos constantes, por cinco minutos. Seguiram-se centrifugação, a 13.000g por três minutos, e descarte do etanol. Foi adicionado 300µl de solução de lise celular (DNA Isolation Kit[®]) em cada tubo com as amostras desparafinadas. Nesta etapa foram utilizados os pistilos para comprimir e homogeneizar os fragmentos no fundo do tubo fazendo-se 50 movimentos circulares, no sentido horário. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos; tratadas com adição de 1,5µl proteinase K (15mg/ml) (Sigma Aldrich, EUA) e homogeneizadas por inversão dos tubos. A seguir, foram incubadas a 55°C durante a noite, e tratadas com 1,5µl RNase (4mg/ml) (Sigma Aldrich, EUA). Após a adição da RNase, os tubos foram homogeneizados por inversão, e incubadas a 37°C por uma hora. À temperatura ambiente, as amostras foram tratadas com 100µl solução de precipitação de proteína (Kit DNA Puregene[®]). As amostras foram submetidas à homogeneização com auxílio de um

aparelho vórtex para agitação (*Certomat*[®] *MV*, B. Braun, Alemanha) por 20 segundos e centrifugação a 13.000g por três minutos. Em seguida o sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5ml contendo 300µl de isopropanol (Merck, Alemanha), homogeneizado cuidadosamente por inversão do tubo; centrifugado a 13.000g por cinco minutos; descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 300µl de etanol 70% (Merck, Alemanha) e centrifugou-se a 13.000g por um minuto, descartando cuidadosamente o sobrenadante. Após a secagem completa do tubo à temperatura ambiente, foi adicionado ao DNA extraído 20µl de solução de hidratação (Kit DNA Puregene[®]), sendo em seguida estocado a 4°C.

A extração do DNA de sangue periférico embebido em papel de filtro foi realizada pela técnica descrita por da Silva et al. (2006) com modificações. As amostras de sangue sem anticoagulante, aproximadamente um mililitro, coletadas no dia da avaliação clínica foram aplicadas sobre papel filtro *FTA*[®] *Classic Card* e secadas naturalmente. Cinco fragmentos do papel de filtro embebido com o sangue foram obtidos, de forma aleatória, com auxílio um “punch” de dois milímetros de diâmetro (*Punch para Biópsia*[®], Kolplast ci LTDA, Brasil). As amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5µl de capacidade contendo 200µl de solução tampão de lise (*FTA*[®] *Purification Reagent*, Whatman, EUA) e foram submetidas à agitação com auxílio de um aparelho vórtex por 20 segundos, sendo homogeneizadas por cinco minutos à temperatura ambiente, em movimentos constantes com auxílio de um Lab Rotator[®], e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após a terceira lavagem, 200µl de solução tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) foi adicionado ao tubo de microcentrífuga contendo os discos de papel, seguido por nova agitação em vórtex por vinte segundos e incubação à temperatura ambiente por mais cinco minutos; o sobrenadante obtido foi descartado. Este procedimento foi repetido duas vezes. Os discos de papel de filtro contendo DNA, foram estocados a 4°C para serem

utilizados na realização da técnica de PCR.

A amplificação do DNA através da PCR específica, o desenho dos iniciadores da reação bem como o protocolo da PCR foram realizados segundo a técnica descrita por Piarroux et al. (1993), com modificações, conforme procedimento básico descrito a seguir: A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (PTC-100[®], M.J. Research Inc., EUA), utilizando-se o par de iniciadores LV1 e LV2 (Quadro 1) específicos para o complexo donovani (INVITROGEN BRAZIL, Brasil).

QUADRO 1

Iniciadores utilizados nas amplificações pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Iniciador	Seqüência	Número de nucleotídeos
LV ₁	5' ACGAGGTCAGCTCCACTCC 3'	19
LV ₂	5' CTGCAACGCCTGTGTCTACG 3'	20

Para a amplificação, 15pmol de DNA ou um disco de papel de filtro contendo DNA, foi adicionado a uma mistura contendo 15pmol de iniciador LV₁; 15pmol de iniciador LV₂; 7µl de “Go Taq[®] Green Master Mix”; 3,5µl de H₂O deionizada “nuclease free” (Kit Go Taq[®] Green Master Mix, Promega, EUA). Em todas as reações foram utilizados controles positivos e negativos. Os controles da reação para o material da biópsia de pele de orelha foram: DNA extraído de material de fragmento de pele de orelha emblocado em parafina de cão sabidamente portador de LV, DNA extraído de fragmento de pele de orelha emblocado em parafina de cão negativo para a doença. Para a reação com o papel de filtro, os controles foram: papel de filtro sem sangue, papel de filtro embebido com o sangue de cão positivo e

papel de filtro embebido com o sangue de cão negativo para *L. chagasi*. Tanto para a reação do material emblocado em parafina, como para o papel, foram adicionados 1ng de DNA de *L. chagasi*, cepa MOHM/BR/1967/BH46, obtida em meio de cultura, e um controle com todos os reagentes utilizados na reação exceto o DNA. A amplificação foi realizada a partir de um passo inicial de desnaturação por cinco minutos a 95°C; anelamento por 30 segundos a 59°C (ligação dos iniciadores); extensão a 72°C por trinta segundos e desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguidos por 33 ciclos iguais; a extensão final ocorreu a 72°C por dois minutos. Os componentes da reação estão representados no QUADRO 2.

QUADRO 2

Componentes da reação em cadeia da polimerase (PCR) específica por tubo de Reação

Componentes	Quantidade
“Go Taq [®] Green Master Mix”*	7µl
Iniciadores LV ₁ e LV ₂	1,5µl de cada – 10pmol/µl
DNA extraído	1,5µl ou um disco de papel
H ₂ O “nuclease free”* q.s.p.	15µl

* Kit Go Taq[®] Green Master Mix (Promega, EUA)

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (Sigma Aldrich, EUA) não desnaturante em TBE (89mM TRIS-BORATO, 2mM EDTA, pH 8,0) por aproximadamente duas horas, ou até que o corante xileno-cianol utilizado no marcador de peso molecular tivesse percorrido dois centímetros. Foi utilizado como marcador de peso molecular de 100pb (Promega, EUA). Foram aplicados 4µl do produto amplificado por canaleta, que foram submetidos a uma tensão de 120 volts. Após a eletroforese, os fragmentos amplificados, foram visualizados por coloração pelo nitrato de prata (Synth, Brasil), segundo técnica descrita por Santos et al. (1993), com modificações. O gel foi fixado à temperatura ambiente por cinco minutos em solução contendo 10% de etanol

absoluto (v/v) (Merck, Alemanha) e 0,5% de ácido acético (v/v) (Merck, Alemanha), seguida de incubação por 5 minutos em 150ml de solução contendo 0,7% de nitrato de prata (p/v) (Synth, Brasil), e de nova incubação com uma solução reveladora contendo 3% de NaOH (p/v) (Merck, Alemanha) e 0,1% de formaldeído 37% (v/v) (Merck, Alemanha), por 10 minutos ou até o aparecimento das bandas, sempre sob agitação suave (*Orbit Shaker*[®], Lab-Line, EUA). Posteriormente o gel foi transferido para a solução fixadora e documentado por fotografia para análise. A contaminação da reação por amplicons foi evitada pelo uso de diferentes ambientes para o processamento das amostras, além dos processos rotineiros de descontaminação das áreas de trabalho.

7.3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística de acordo com a natureza dos dados pelos testes que mais se aplicaram a cada caso, com o auxílio de programas dos pacotes estatísticos SPSS[®] versão 12 e MiniTab[®] versão 14.

Para comparação das amostras antes e depois quando os dados eram contínuos, como por exemplo, os valores da sorologia, peso, hemograma e bioquímica sérica, foi realizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Não se optou pela utilização de teste paramétrico nestes casos devido ao fato dos dados não serem normalmente distribuídos ou seguirem alguma distribuição de probabilidade conhecida. Para os testes em que houve comparação de proporções entre amostras pareadas, como por exemplo, o exame clínico, a PCR, a imuno-histoquímica e a relação A/G, foi utilizado o Teste T. Para determinação do grau de associação entre as variáveis, foi utilizado o teste não paramétrico “Correlação de Spearman”. Optou-se por este método por basear-se na ordenação de duas variáveis sem qualquer restrição quanto à distribuição de valores.

Para a apresentação gráfica foi utilizado o programa Excel for Windows[®] (Microsoft, EUA).

RESULTADOS

8 – RESULTADOS

8.1 – SELEÇÃO DA AMOSTRA

A análise do banco de dados do Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB, no período de janeiro de 2004 e dezembro de 2005 indicou as clínicas identificadas por A, B e C como as solicitantes do maior número de exames para identificação de animais soropositivos para LV. Os resultados são apresentados na TAB. 1.

TABELA 1

Relação entre o número de amostras analisadas no Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG do ICB procedente de três clínicas veterinárias de Belo Horizonte e o resultado de exame de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), entre janeiro de 2004 e dezembro de 2005

Clínica Veterinária	Número de amostras enviadas ao Laboratório de Sorologia	RIFI com título igual ou superior a 1:40	Percentual de resultados de RIFI positivos ($\geq 1:40$)
A	1219	418	34,29
B	1132	485	42,84
C	2221	942	42,41

Foram identificados como animais submetidos ao tratamento para LVC, aqueles que, após o primeiro teste positivo na RIFI, tiveram este exame repetido para até a diluição reativa final (TAB. 2).

TABELA 2

Cães candidatos ao tratamento para leishmaniose visceral por clínica veterinária, selecionados pela repetição da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em diluição reativa final do soro

Clínica Veterinária	RIFI positiva (número de amostras)	RIFI positiva em diluição reativa final (número de cães)	Frequência de cães candidatos ao tratamento (%)
A	334	65	19,46
B	364	104	28,57
C	700	165	23,57

Após a análise dos resultados, foi selecionada para participar das demais etapas deste projeto a clínica B, uma vez que apresentou maior percentual de cães candidatos ao tratamento em relação ao número de animais positivos para a doença.

A clínica veterinária B, de nome fantasia Clínica Veterinária Santo Agostinho[®], fundada em 1981, funciona em sistema de plantão 24 horas, e possui atualmente oito médicos veterinários em seu quadro permanente de funcionários. Realiza o tratamento de LVC há cerca de dez anos, utilizando de diferentes protocolos terapêuticos. A droga atualmente utilizada como de eleição para o tratamento de LVC é a Anfotericina B. Entre janeiro de 2004 e dezembro de 2005, foram realizadas 5221 consultas clínicas em animais de estimação (cães, gatos e animais silvestres), correspondendo a uma média de 218 atendimentos mensais.

Do total de 5221 consultas clínicas, 369 (6,9%) foram cães portadores de LV, destes 104 animais foram submetidos ao tratamento, o que corresponde a aproximadamente 2% do total de atendimentos realizados por esta clínica, nesse intervalo de tempo, dos atendimentos realizados no mês.

Dos 104 animais submetidos ao tratamento para LVC, sete evoluíram para óbito,

correspondendo a 6,73% do total. Destes casos, dois animais (1,9%) foram submetidos ao processo de eutanásia a pedido de seus proprietários, ambos cerca de três meses após o término das sessões de quimioterapia, sob alegação de impossibilidade de continuar o tratamento. Os demais cães (4,8%) evoluíram para o óbito, em períodos variados. Três animais faleceram em consequência de insuficiência renal crônica, complicação associada à LVC, e os demais por falência cardiovascular não associada à doença. Dos 97 casos restantes, 70 animais foram tratados com o protocolo de eleição, associados ou não a imunoterapia. Dentre estes 70 animais, 31 foram tratados exclusivamente com Anfotericina B, e estão sendo mantidos em domicílio, fazendo uso diário de Alopurinol. Por meio de contato telefônico, todos os proprietários dos cães selecionados foram informados da realização deste projeto e se dispuseram a colaborar sem restrições. A assinatura do termo de anuência ocorreu quando da realização da avaliação clínica no cão.

Os 31 animais selecionados pertencem a várias raças e, ao início do tratamento, tinham idade variando entre sete meses e 10 anos e quatro meses (média de três anos e cinco meses), sendo 20 machos e 11 fêmeas. Os sinais clínicos de LVC apresentados nesta fase foram categorizados em: Aparência Geral, que inclui a condição corporal, atitude e locomoção; Viscerais, onde foi avaliada a presença de hepatomegalia e/ou de esplenomegalia; Outras, que abrange alterações de menor frequência na LVC, como as oftalmológicas e a epistaxe (QUADRO 3, ANEXO D).

8.2 – PROTOCOLO DE TRATAMENTO

A Clínica Veterinária Santo Agostinho[®] utiliza rigorosos critérios de seleção para a realização do tratamento de LVC, relacionados com a condição clínica e laboratorial dos animais candidatos, bem como aqueles referentes à colaboração do seu proprietário.

O proprietário é informado a cerca de todo o processo de evolução da doença e do tratamento,

incluindo orientações sobre profilaxia, prevenção e controle da LV.

Após concordar com as condições propostas para o tratamento e manutenção do cão, o proprietário assina um termo de responsabilidade (ANEXO E) e é orientado a adotar medidas de prevenção contra a ação dos insetos vetores, tanto diretamente no animal quanto no ambiente em que este será mantido (ANEXO F).

Após avaliação clínica, o cão é submetido aos exames laboratoriais prévios ao tratamento, que incluem: hemograma completo; perfil renal; perfil hepático; determinação da diluição reativa final da RIFI; imuno-histoquímica de fragmento de face interna da orelha; esfregaços de aspirado de medula óssea ou linfonodo, e PCR de medula óssea. Os cães que apresentarem anormalidades nos resultados dos exames preliminares são reavaliados e submetidos a tratamentos prévios para a correção e controle destas alterações.

São duas as principais causas que impedem os cães de serem submetidos ao tratamento de LV na Clínica Veterinária Santo Agostinho[®]: a insuficiência renal crônica e a idade avançada (superior a 10 anos). Na primeira condição o proprietário é aconselhado a submeter seu cão ao procedimento de eutanásia. Na segunda, é proposto protocolos alternativos de tratamento, que neste projeto não serão abordados.

A terapia foi realizada em 16 aplicações de Anfotericina B desoxicolato na dose de 0,6mg/kg, por via endovenosa, diluída em 100ml de solução glicosada a 5%, na velocidade de 40 a 60 gotas por minuto a cada 72 horas, com o cão em regime de internação. Antes da aplicação de cada dose foi colhido sangue para a dosagem de uréia, e administrada por via endovenosa solução parenteral de glicose 5% (20ml/kg), com velocidade de infusão de 40 gotas por minuto. Após a infusão do fármaco, cada animal recebeu ainda, via endovenosa, 250ml de solução glicosada a 5% com velocidade de infusão de 40 gotas a 60 gotas por minuto. Nos paciente que pesaram menos de cinco quilogramas, a dose da solução glicosada foi de

20ml/kg. Foram administrados, em sessões alternadas a partir da primeira, 0,2mg/kg de Dexametasona antes da aplicação da Anfotericina B, junto à primeira infusão de solução glicosada. Ao fim de cada sessão, o cão recebeu alta médica e foi para a casa do seu proprietário, e retornou à clínica para nova sessão a cada 72 horas. Em três animais houve suspeita de episódio de insuficiência renal aguda e, por isto, foi dosado também a creatinina. Os animais que apresentaram valores acima do padrão fisiológico para qualquer das duas substâncias, ou seja, maior que 0,5-1,5mg/dL para creatinina, e maior que 8-25mg/dL para uréia (DiBARTOLA, 1997), foram impedidos de receber a droga até a normalização dos exames. Os animais, neste caso, foram submetidos apenas à infusão de solução glicosada a 5% e dexametasona. Após as 16 aplicações de Anfotericina B, os cães que apresentaram os exames clínico e laboratorial normais, foram considerados clinicamente curados de LV, e entraram na fase de manutenção do tratamento, que consistiu no uso constante de Alopurinol (20mg/kg) a cada 12 horas, 500mg de Vitamina C a cada 12 horas, para controle do pH urinário, e 0,5mg/kg de Levamizol em dias alternados, como droga imuno-estimulante.

Durante a fase de aplicação da Anfotericina B cerca de 25% dos cães apresentaram alguma reação adversa. As principais foram: vômitos, anorexia, inapetência, diarreias.

A cada três meses durante o primeiro ano, e quatro meses no segundo ano, os animais retornaram a clínica para realização de exames de controle.

8.3 – EXAME CLÍNICO DOS PACIENTES

No momento da avaliação clínica, foi observado em todos os cães o uso de medidas profiláticas contra a ação dos flebotomíneos. A maioria, 22 (70,1%) fazia uso de coleiras impregnadas com Deltametrina a 4% (*Scalibor*[®], Intervet, Holanda). Nos nove animais restantes, os proprietários afirmaram utilizar mensalmente repelentes tipo *top spot* (*Pulvex*[®] *Pour on*, Schering-Plough Coopers, EUA).

O exame clínico foi realizado individualmente, entretanto, alguns parâmetros são apresentados como média do grupo todo ou categorizados. O peso corporal e a temperatura retal são parâmetros importantes na avaliação clínica dos animais. O grupo apresentou 12,68% de ganho de peso médio no intervalo de tempo entre o início do tratamento ($22,48 \pm 15,41\text{kg}$) e o momento da avaliação ($24,43 \pm 15,92\text{kg}$). Este resultado foi estatisticamente significativo ao nível de 5% de confiança ($p < 0,001$; Teste de Wilcoxon). A variação da temperatura retal média dos animais antes do tratamento ($39,1 \pm 0,39^\circ\text{C}$) e no momento da avaliação ($38,9 \pm 0,52^\circ\text{C}$) também foi significativa ao nível de 5% ($p = 0,018$; Teste de Wilcoxon). Os valores médios de frequência de batimentos cardíacos (103,9 por minuto) e de movimentos respiratórios (94,4 por minuto) não apresentaram diferenças estatisticamente significativa.

Os animais foram categorizados pela presença de sinais clínicos considerando-se qualquer sinal de LVC, independente do número de apresentações, para a categoria de sintomático. Os resultados são mostrados no GRAF. 1, e foram significantes ao Teste T para comparação entre amostras pareadas ($p < 0,001$).

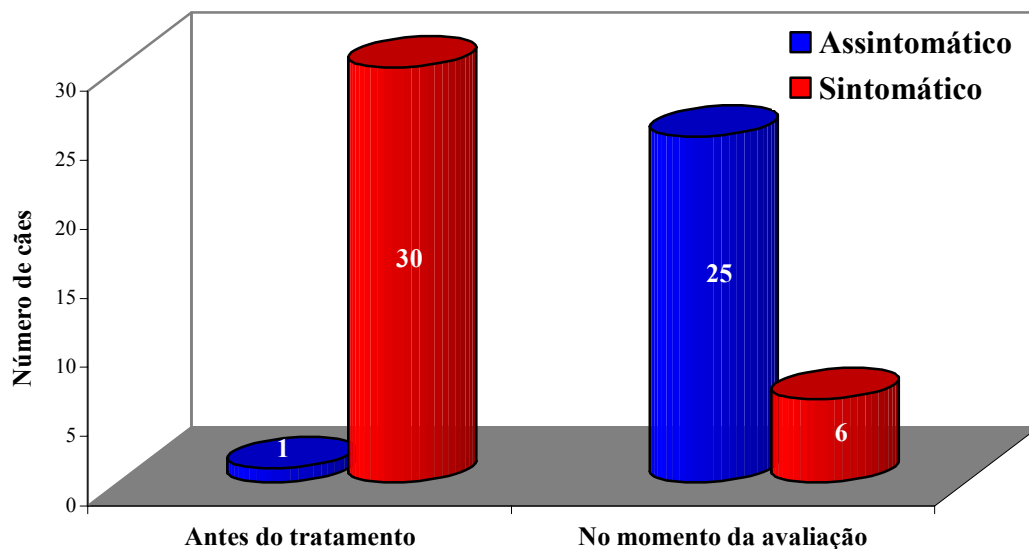


GRÁFICO 1 - Número de cães com presença ou ausência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em período de manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica

Os sinais clínicos observados e a frequência em que se apresentaram antes do tratamento e no momento da avaliação individual estão representados no GRAF. 2. Estes sinais clínicos, quando da nossa avaliação, foram categorizados de acordo com a classificação adotada para a fase de pré-tratamento: Aparência Geral, Linfadenopatia, Sinais Dermatológicos, Sinais Viscerais, e Outros. A linfadenopatia e as alterações dermatológicas, foram os sintomas mais frequentes antes do tratamento (90,02% e 74,5%) e para os animais que permaneceram sintomáticos no período em que foram avaliados (12,9% e 19,4%). Considerando o nível de significância de 5% no Teste T para comparação de proporção em amostra pareada, há evidências estatísticas de que os animais apresentaram melhora no exame clínico, quando comparados ao exame antes do início do tratamento ($p < 0,001$).

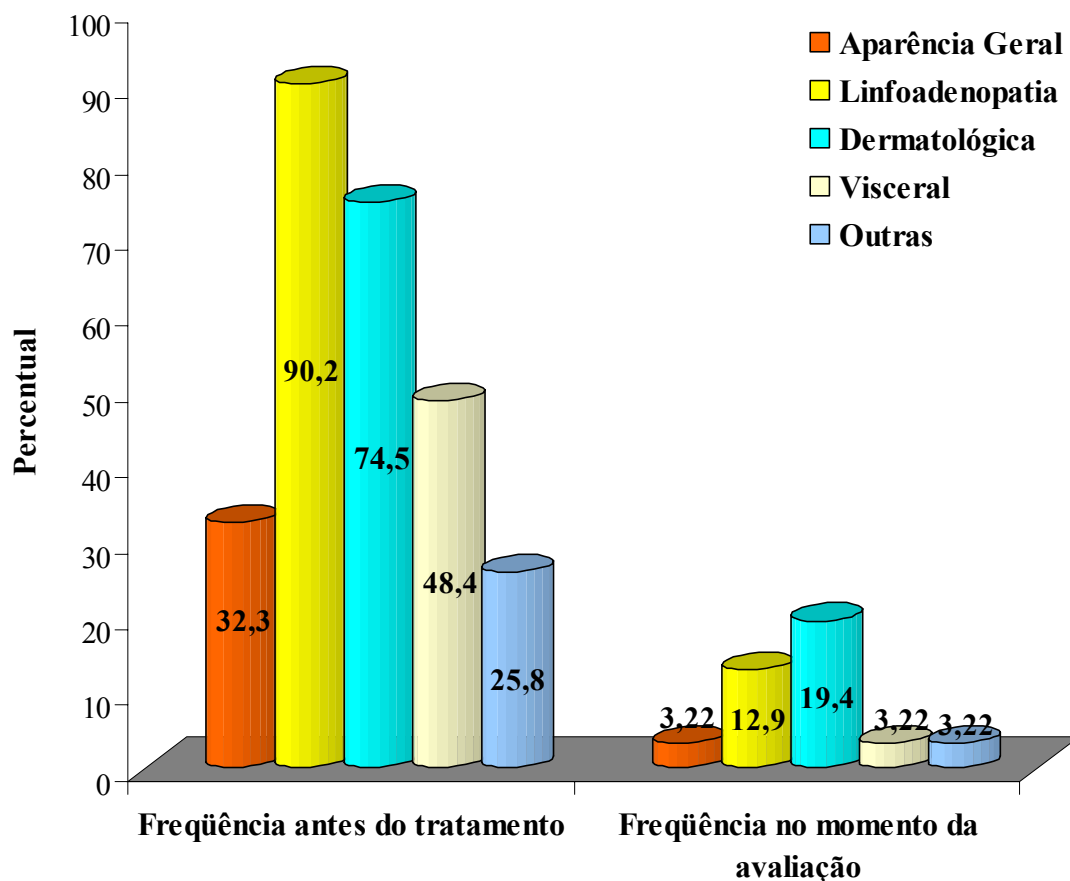


GRÁFICO 2 - Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em período de manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica

8.4 – EXAMES LABORATORIAIS

8.4.1 – EXAMES SOROLÓGICOS

8.4.1.1 – REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

A RIFI foi o teste utilizado para a comparação dos níveis de anticorpos apresentados pelos cães antes e durante o acompanhamento da resposta ao tratamento. Para possibilitar a análise

comparativa do grupo, trabalhou-se com as diluições finais obtidas nos exames. Antes do tratamento o valor máximo de diluição observado foi 1:20.480 e o mínimo 1:320, com média de 1:4.335. No momento da avaliação, durante o período de manutenção com o Alopurinol, o valor máximo da diluição reativa foi 1:10.240 e o mínimo menor que 1:40, com média em 1:1.190. A TAB. 3 mostra a frequência das diluições apresentadas pelos animais.

TABELA 3

Número de animais e respectivo valor da diluição reativa final da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), antes do tratamento e no momento da avaliação clínica

Diluição reativa final da RIFI	Número e percentual de animais antes do tratamento	Número e percentual de animais no momento da avaliação
Não reativo (negativo)	0	7 (22,6%)
1:40	0	1 (3,22%)
1:80	0	3 (9,68%)
1:160	0	3 (9,68%)
1:320	2 (6,45%)	5 (16,3%)
1:640	5 (16,3%)	4 (12,90%)
1:1280	6 (19,35%)	1 (3,22%)
1:2560	4 (12,90%)	4 (12,90%)
1:5120	8 (25,80%)	2 (6,45%)
1:10240	5 (16,3%)	1 (3,22%)
1:20480	1 (3,22%)	0
Total	31 (100%)	31 (100%)

Antes do início do tratamento 29/31 animais apresentavam títulos na RIFI superiores a 1:320, quando avaliados, 12/31 encontravam-se nesta faixa de títulos. Ao nível de significância de 5%, há evidências estatísticas de que os valores de diluição reativa final da RIFI foram menores no momento da avaliação quando comparados àqueles encontrados antes do início

do tratamento ($p < 0,001$; Teste de Wilcoxon).

8.4.1.2 – ELISA

O teste de ELISA foi realizado antes do tratamento e na avaliação, como confirmação de diagnóstico. Todos os soros foram testados na diluição única de 1:400, e o corte de leitura de absorbância de 0,100nm foi utilizado como discriminante entre os resultados positivo e negativo. Antes de iniciar o tratamento, todos os animais eram positivos ao teste. No momento da avaliação, 12 dos 31 animais apresentavam-se negativos. Esta diferença é estatisticamente significativa ao nível de 5% ($p < 0,001$; Teste T para comparação de amostras pareadas).

8.4.2 – IMUNO-HISTOQUÍMICA

No GRAF. 3 é mostrado o número de cães que apresentaram resultados positivos e negativos na imuno-histoquímica realizada em fragmento biopsiado de pele de uma das orelhas dos animais. O número de cães com resultado negativo na pesquisa de antígeno do parasito pela imuno-histoquímica, no momento da avaliação foi, ao nível de significância de 5%, maior que o número de cães com resultado negativo antes do tratamento ($p < 0,001$; Teste T para comparação de proporção em amostra pareada).

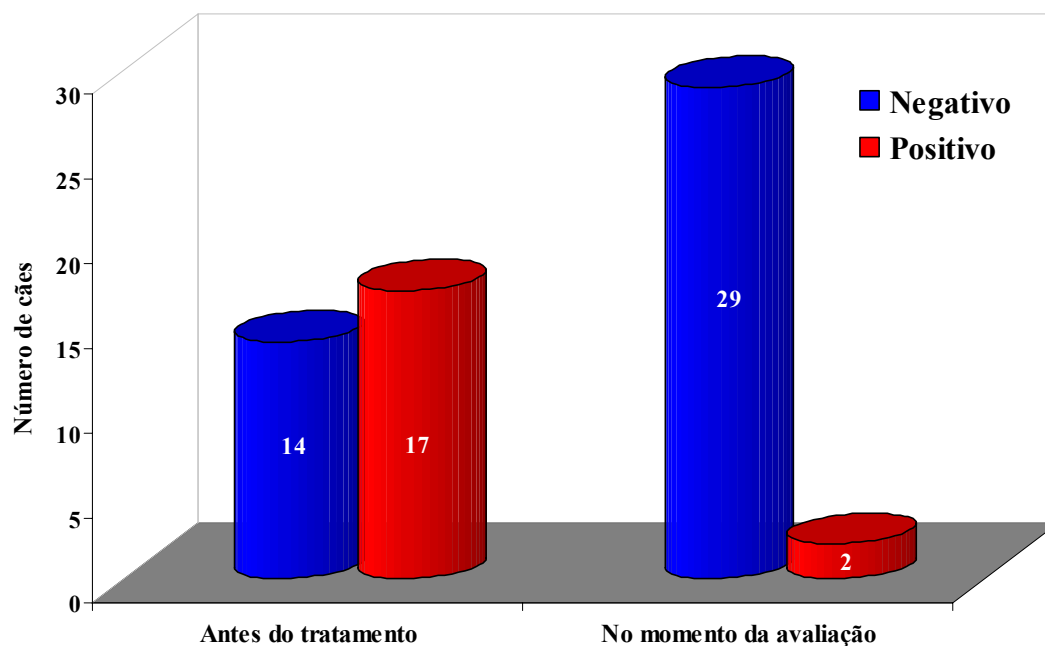


GRÁFICO 3 - Resultado da Imuno-histoquímica realizada em fragmento biopsiado de pele da face interna de uma das orelhas de cães submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica

8.4.3 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Os resultados obtidos pela aplicação da técnica de PCR nos fragmentos de pele de orelha dos animais estão expressos no GRAF. 4. O número de cães que possuíam resultado negativo no momento da avaliação foi maior que o número de cães com resultado negativo antes do tratamento ao nível de significância de 5% ($p < 0,001$; Teste T para comparação de proporção em amostra pareada).

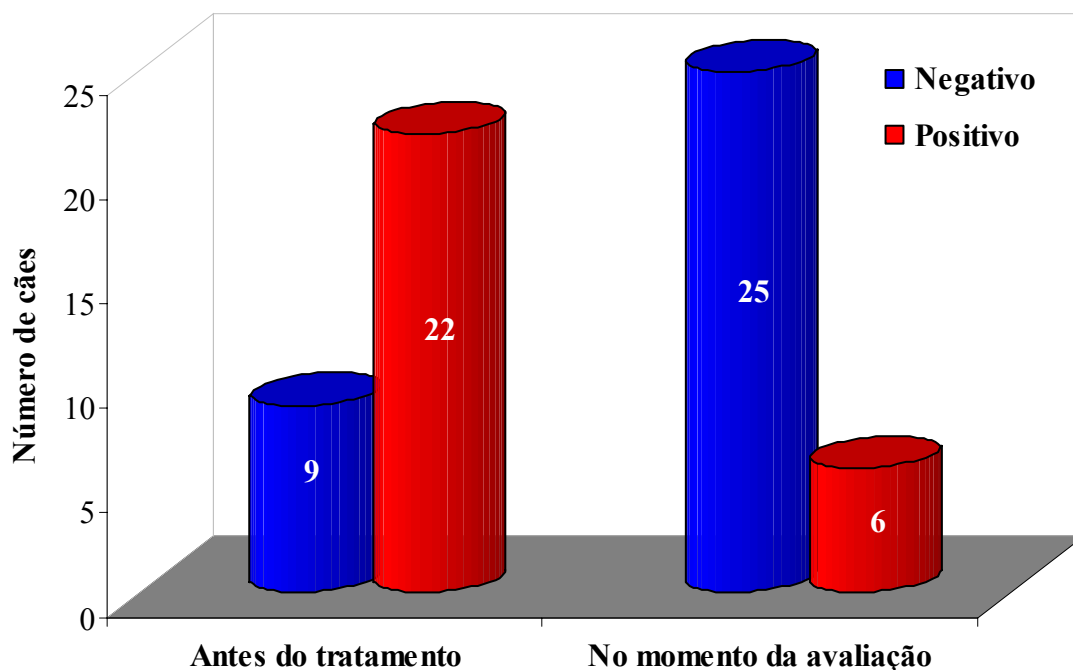


GRÁFICO 4 - Resultado da PCR de fragmentos de pele biopsiada da face interna de uma das orelhas de cães submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica

A comparação entre os resultados obtidos pela aplicação das duas técnicas de demonstração indireta da presença do parasito na pele da orelha estão expressados na TAB. 4.

TABELA 4

Comparação entre os resultados obtidos pela realização de imuno-histoquímica e de PCR em fragmento biopsiado de pele da face interna de uma das orelhas de cães, submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica

Técnica	Antes do tratamento		No momento da avaliação	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Imuno-histoquímica	14	17	29	2
PCR	9	22	25	6

A análise estatística destes dados indicou uma correlação positiva entre as duas técnicas para a avaliação da presença de parasitos em fragmento biopsiado de pele da orelha dos animais, tanto para os resultados obtidos antes do tratamento (Correlação de Spearman = 0,57), como

para aqueles obtidos no momento da avaliação (Correlação de Spearman = 0,536), ao nível de 5% de confiança.

Todos os resultados positivos no teste de imuno-histoquímica, tanto antes do tratamento, como no momento da avaliação, coincidiram com aqueles positivos da PCR. O índice de concordância entre as duas técnicas foi moderado, tanto para os resultados obtidos antes do tratamento ($\kappa = 0,529$), quanto para aqueles obtidos no momento da avaliação ($\kappa = 0,446$).

Nas amostras de sangue coletadas no momento da avaliação todos os resultados de PCR foram negativos.

8.4.4 – HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

Os parâmetros avaliados no hemograma nos animais submetidos ao tratamento foram: o eritrograma, o leucograma e a contagem total de plaquetas. Os resultados obtidos estão expressos na TAB. 5.

TABELA 5

Comparação entre os resultados obtidos no hemograma em cães submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B, em manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica

Variável	Média		Mínimo		Máximo	
	Antes do tratamento	No momento da avaliação	Antes do tratamento	No momento da avaliação	Antes do tratamento	No momento da avaliação
Eritrograma* (x 10 ⁶ /dl)	6,221 ± 1,374	7,187 ± 1,081	3	4,9	8,9	9
Leucograma** (x 10 ³ /dl)	8,584 ± 3,005	8,371 ± 3,605	5	5	20	24
Plaquetas*** (x 10 ³ /dl)	208,06 ± 44,98	197,42 ± 43,05	120	120	300	300

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

Destas variáveis, os valores do eritrograma no momento da avaliação foram maiores que os valores antes do tratamento, ao nível de confiança de 5% ($p < 0,001$; Teste de Wilcoxon). Os valores do leucograma e contagem de plaquetas não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Os valores das dosagens de uréia sérica, creatinina sérica e proteínas totais foram encontrados de forma geral dentro dos valores do intervalo considerado fisiológico.

8.4.5 – RELAÇÃO ALBUMINA/GLOBULINAS (A/G)

A relação entre a albumina e as globulinas sérias é um parâmetro considerado importante na avaliação dos animais. Valores inferiores a 0,6 são considerados críticos para o prognóstico de evolução da doença no animal. Assim, os dados foram agrupados em dois valores: menor e igual ou maior que 0,6. Os resultados da relação entre albumina e globulinas sérias são apresentados no GRAF. 5.

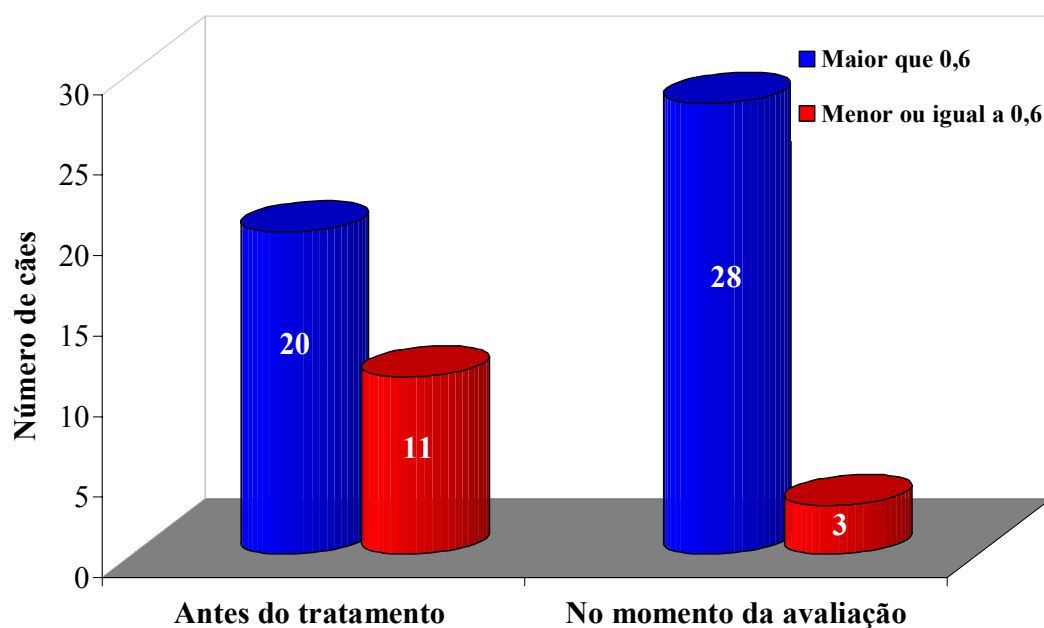


GRÁFICO 5 - Relação entre albumina e globulinas sérias, em cães submetidos a protocolo de tratamento com Anfotericina B em manutenção com Alopurinol, antes do tratamento e no momento da avaliação clínica

A análise dos dados demonstrou que houve aumento nos valores da relação A/G no momento da avaliação, quando comparado aos valores antes do tratamento. Este aumento foi estatisticamente significativo ao nível de confiança de 5% ($p < 0,001$; Teste T para comparação de proporção em amostra pareada).

Não foi demonstrada evidências estatísticas da existência de correlação entre A/G e o resultado do exame clínico dos animais, nem antes, nem no momento da nossa avaliação.

DISCUSSÃO

9 – DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é uma doença grave e o cão é o responsável pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, sendo considerado o mais importante reservatório da forma zoonótica da doença (ALVAR et al., 2004; DEANE, 1956), quer pela alta prevalência da doença nestes animais, quer pela presença de formas amastigotas na pele.

As estratégias de controle da endemia, ainda que consideradas pouco efetivas, estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da população de flebotomíneos vetores e na eliminação dos cães domésticos soropositivos, associadas à atividades de educação em saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

A eutanásia dos animais soropositivos como medida de controle é recomendado pela OMS e a OPAS. Entretanto, estas entidades reconhecem que existem animais de grande valor afetivo, econômico, zootécnico e prático, e que por isso não devem ser indiscriminadamente sacrificados (WHO, 2005; OPAS, 2006).

O tratamento da LVC, praticado em alguns países europeus, tem sido discutido principalmente sob dois aspectos: sua eficácia, ou seja, a capacidade de determinar a cura dos animais (NOLI & AUXILIA, 2005) e, sob a ótica da Saúde Pública, sua interferência nos programas de controle, considerando a recusa formal dos proprietários em permitir o sacrifício de seus animais e número desconhecido de cães sendo submetidos ao tratamento.

A avaliação sistematizada de cães submetidos ao tratamento e mantidos domiciliados é estudada pela primeira no Brasil, no presente trabalho. O nosso estudo envolve a avaliação do protocolo terapêutico para a LVC, associada à participação do proprietário deste animal no contexto do processo de tratamento do seu cão. A participação responsável do proprietário é o primeiro passo para o sucesso do tratamento de qualquer afecção animal. Por outro lado as

relações afetivas entre o cão e seu proprietário podem influenciar positivamente na resposta do animal frente à terapia.

A análise do banco de dados do Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, no período de janeiro de 2004 e dezembro de 2005, mostrou alta taxa de incidência da doença ($39,84 \pm 3,93\%$) em amostra de animais provenientes de Clínicas Veterinárias de Belo Horizonte. Estes valores refletem a indicação da sorologia como uma maneira de confirmar a suspeita clínica e não de forma aleatória, como nos inquéritos amostrais. Entretanto, quando foram confrontados os animais soropositivos, supostamente candidatos ao tratamento quimioterápico, da clínica escolhida para este estudo, verificou-se baixa proporção de cães sendo submetidos ao tratamento para LV, quando comparadas à rotina diária de atendimentos. Considerando que esta é uma clínica de referência nacional no tratamento da LVC, o baixo índice de animais submetidos ao tratamento (2% dos animais atendidos no período) indica que esta não é uma opção freqüente entre os proprietários de cães portadores de LV. O pequeno número de opção pelo tratamento pode ser decorrência de pelo menos três fatores: o custo do processo, que inclui exames clínicos, laboratoriais, internamento do animal e medicamentos; a exigência, por parte da Clínica, do cumprimento de um protocolo de ações que exigem parceria responsável por parte do proprietário; e por fim, o estado clínico indicativo de eutanásia. É preciso considerar, ainda, que a falta de regulamentação do tratamento pelos órgãos de saúde pública do Brasil também pode influir na decisão de alguns proprietários de animais doentes.

Os critérios estabelecidos para a inclusão dos animais neste estudo foram rigorosos para permitirem a comparação entre o grupo de animais antes e durante o período de avaliação. Neste grupo encontravam-se animais entre seis e onze meses após o tratamento (09), entre 12 e 18 meses (10) e acima de 18 meses (12). Note-se que os animais sintomáticos durante a nossa avaliação estavam em período médio de manutenção (12 a 18 meses). Entretanto,

apenas no animal de número 16 os sintomas podem ser considerados como recrudescentes, visto que em avaliações anteriores foi considerado assintomático.

O protocolo de tratamento, utilizando Anfotericina B foi escolhido por ser a droga de livre comércio e apontada como promissora para a cura definitiva dos animais, embora com evidências ainda insuficientes para sua recomendação definitiva (NOLI & AUXILIA, 2005).

A utilização do Alopurinol após o tratamento com a Anfotericina B pode ser considerada positiva no sentido da sustentação da resposta ao medicamento, desde que diferentes protocolos de tratamento para LVC com Alopurinol já foram descritos como indutores da gradual remissão dos sinais clínicos, recuperação das anormalidades clínico patológicas e diminuição do nível de anticorpos específicos circulantes mesmo quando usado sozinho (KUOTINAS et al. 2001; VERCAMMEN et al. 2002).

A ausência de sinais clínicos é freqüentemente relatada em 50% a 60% dos animais com LVC (ALVAR et al., 2004; FERRER, 1999; GRADONI, 2002). Estes resultados contrastam com os dados encontrados na análise dos prontuários dos animais, onde cerca de 98% dos cães apresentavam algum sinal clínico compatível com a LV.

O fato da Clínica Veterinária Santo Agostinho[®] ser referência no diagnóstico e tratamento da LVC e receber encaminhamentos de animais provenientes de outras clínicas pode ter sido determinante para a seleção da alta taxa de animais com sinais compatíveis com a doença. Outro aspecto a se considerar é o fato de que a amostra ora avaliada, não corresponde à população canina portadora da doença relatada em inquéritos epidemiológicos.

Os sinais clínicos mais comuns foram a linfadenopatia e as lesões dermatológicas, que se encontram entre os achados mais freqüentes em cães acometidos por LV (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; COSTA VAL, 2004; FERRER, 2002).

Os linfonodos mais afetados foram os submandibulares em cerca de 70% dos cães. Doze dentre os animais avaliados apresentaram aumento de todos os linfonodos examinados e encontravam-se entre os cães com maior número de alterações clínicas.

As lesões dermatológicas mais comuns citadas nos prontuários foram as dermatites seborréicas e nodulares, alopecias perioculares, descamação e onicogribose. Estas alterações estão dentro dos padrões citados na literatura para cães portadores de LV (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; COSTA VAL, 2004).

Entre as alterações viscerais encontradas em 15 (48,4%) dos animais, a esplenomegalia foi a alteração mais diagnosticada pela palpação abdominal. A hepatomegalia foi observada em apenas dois cães no momento do exame. As duas alterações são devidas à ação direta do parasito, associado a hiperplasia das células do sistema mononuclear-fagocitário presentes em grande número nestes órgãos. Amusategui et al. (2003) e Costa Val (2004), apontam a esplenomegalia como a alteração mais comum quando da palpação abdominal em cães com leishmaniose visceral.

As alterações oculares foram reportadas em cinco prontuários, sendo as principais a ceratoconjuntivite e a uveíte. Estas alterações parecem estar associadas à deposição de imunocomplexos, tanto circulantes como produzidos *in situ*, que se depositam sobre as células endoteliais, e presença inflamações granulomatosas ou difusas associadas à presença do parasito (PEÑA et al., 2000; SAUQUILLO, 2005).

As poliartrites e lesões ósseas, causadas pela deposição de imunocomplexos ou presença do parasito nas articulações são relatos raros na LVC (GIMÉNEZ, 2005). Neste trabalho, um animal apresentou claudicação, provavelmente em decorrência deste processo.

O protocolo adotado para o tratamento da LVC na Clínica Veterinária Santo Agostinho®

condiz com o recomendado pela literatura (ALVAR et al., 2004; BANETH, 2006; BANETH & SHAW, 2002; NIETO et al., 2005). A clínica adiciona ao protocolo padrão o uso de Vitamina C diariamente, visando à redução do pH urinário e conseqüente diminuição da produção de urólitos de xantina pelos pacientes, um dos possíveis efeitos colaterais associados ao uso constante do Alopurinol. Associa ainda, o uso constante de Levamizol - uma droga primariamente com atividade contra parasitos intestinais e pulmonares - em doses inferiores à terapêutica, como imunoestimulante. Este efeito foi demonstrado em modelos murinos infectados com *L. enriettii* e em humanos acometidos por *L. tropica*, sendo observadas diminuição da severidade das lesões e alterações causadas pelo parasito (BUTLER, 1978; REZAI et al. 1998). Não há relato de imunomodulação do Levamizol em cães com LV, mas acredita-se que o uso constante deste fármaco possa ser benéfico durante a fase de manutenção do tratamento, contribuindo para a diminuição do número e severidade das recaídas, que por ventura possam acontecer ao paciente.

Os efeitos adversos descritos durante aplicação de Anfotericina B estão em acordo com aqueles citados pela literatura (ALVAR et al., 2004; BANETH & SHAW, 2002; LAMOTHE, 2004; NIETO et al. 2005; MIRÓ, 2005).

Houve significativa mudança no padrão clínico destes animais, quando por nós examinados. Cerca de 81% dos cães não apresentavam quaisquer sinais clínicos, sendo considerados assintomáticos. Os cães apresentaram ganho de peso, redução da temperatura retal e remissão da sintomatologia clínica. Estes dados vão de encontro ao relatado sobre o tratamento da LVC com Anfotericina B e manutenção com Alopurinol (LAMOTHE, 1999; LAMOTHE, 2001; LAMOTHE, 2004).

Entre os animais que foram categorizados como sintomáticos (6), cinco (83,5%) apresentaram no máximo dois sinais clínicos de LVC, sendo um deles a linfadenopatia. Segundo

Mancianti et al. (1988), estes animais seriam considerados oligossintomáticos.

Houve queda significativa dos títulos da diluição reativa final da RIFI, comparando os dois períodos avaliados. A literatura já sugere uma queda progressiva no título de anticorpos anti-*Leishmania* após o tratamento, à medida que ocorre remissão dos sinais clínicos e melhora dos demais parâmetros fisiológicos que são afetados pela ação do parasito (ALVAR et al., 1994; MORENO et al., 1999; MORITZ et al., 1999; RHALEM et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Dos animais assintomáticos (25) 18 permaneceram positivos no teste. Por outro lado, os títulos tendem a cair na maioria dos cães tratados, independente do protocolo terapêutico empregado (KOUTINAS et al. 2001; POLI et al., 1997) A velocidade da queda no título dos anticorpos específicos em geral não acompanha a velocidade da recuperação clínica dos cães ante ao tratamento para LV. Os animais, clinicamente curados, podem permanecer soropositivos por anos, durante o período de tratamento (DAY, 2004b).

Dos seis animais classificados como sintomáticos durante a manutenção com o Alopurinol e com média de 15,7 meses de tratamento, quatro apresentaram queda na diluição reativa final da RIFI. Dois mantiveram as mesmas diluições da fase de pré-tratamento. O animal de número 16 foi o que apresentou o maior valor de diluição final da RIFI (1:10.240), condizente com a clínica típica de LVC no momento da avaliação do animal.

Dentre os cães que apresentaram resultado negativo no teste de ELISA (12), 83% possuíam diluição reativa final na RIFI inferior a 1:80. A média de duração de tratamento destes animais é 18,7 meses. Nas condições de realização dos testes, uma observação freqüente no Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG é a negatificação precoce do ELISA em relação à RIFI durante tratamento, independente do protocolo adotado. Não há relatos na literatura sobre a condição da resposta imunológica de animais em tratamento, entretanto, é importante ressaltar que a técnica do ELISA pela alta sensibilidade, é

aplicada para o diagnóstico em soros de cães, no Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG na diluição de 1:400.

Dos 17 cães com resultado de imuno-histoquímica positivo antes do tratamento, 29,2% apresentaram parasitismo discreto; 29,2% apresentaram parasitismo moderado; e 41,6% apresentaram parasitismo intenso, quando se utilizou os critérios considerados por Solano-Gallego et al. (2004). Todos estes animais haviam sido categorizados como sintomáticos para LVC naquele momento. Cerca de 43% dos cães sintomáticos antes do tratamento demonstraram resultado negativo na imuno-histoquímica de pele da orelha. O resultado é compatível com Xavier et al. (2006) que sugerem independência entre o resultado da imuno-histoquímica e o *status* clínico do animal.

No momento da nossa avaliação, dois cães (números 16 e 30) com resultado positivo na pesquisa de antígeno do parasito pela imuno-histoquímica, mostraram quadros diferentes: um apresentou intenso parasitismo enquanto no outro animal o parasitismo era discreto. Ambos foram categorizados como sintomáticos no momento da realização da avaliação clínica dos animais. Autores que estudaram a associação entre carga parasitária e a categorização clínica dos animais mostraram haver correlação entre estas variáveis (REIS et al., 2006).

Na PCR realizada nos fragmentos de pele, emblocados em parafina, o número de animais com resultado positivo para *Leishmania* foi maior que aquele apresentado pela imuno-histoquímica, tanto antes de os cães serem submetidos ao tratamento, como no momento em que foi feita a avaliação clínica deste trabalho. Estes resultados são corroborados por Xavier et al. (2006) e Solano-Gallego et al. (2004), que sugerem que a PCR seja uma técnica mais sensível que a imuno-histoquímica para avaliação de fragmentos biopsiados de pele.

Dos seis animais positivos na PCR da biópsia no momento da avaliação, dois foram categorizados como assintomáticos. Solano-Gallego et al. (2004) discutem o significado da

PCR de fragmento de pele positiva em animais assintomáticos, considerando a sua condição infectante para os vetores. Os autores acreditam que tais animais podem não infectar os flebotomíneos e assim deixam de representar papel relevante na epidemiologia da doença.

Quando da aplicação da técnica da PCR em amostra de sangue periférico, coletada dos cães durante a avaliação, o resultado foi negativo. Parasitos já foram relatados no sangue periférico de animais infectados, sororreagentes, procedentes da mesma região (DE FREITAS et al., 2006). Embora a capacidade infectante dos animais para os insetos vetores esteja associada com a presença do parasito na pele, é possível admitir que a presença dos mesmos no sangue periférico possa ser um importante fator adjuvante a infecção, uma vez que o sangue é o objetivo alimentar das fêmeas destes insetos.

A anemia, a hiperglobulinemia, e a proteinúria são, provavelmente, os mais importantes marcadores clínico-patológico para o acompanhamento da evolução de cães em tratamento para LV (KOUTINAS et al., 2001).

Os animais apresentavam o hemograma antes do tratamento com alterações características descritas na literatura, que indica a maior frequência da diminuição da contagem de eritrócitos em relação a de plaquetas e leucócitos totais (AMUSATEGUI et al., 2003; REIS, et al., 2006; KOUTINAS & SARIDOMICHELAKIS, 2004). Entretanto, considerando os valores fisiológicos para estas variáveis em cães, não houve variação em relação a estes parâmetros. No momento da avaliação, houve aumento significativo no eritrograma, provavelmente devido a menor carga parasitária do animal nesta fase, quando comparada à fase de pré-tratamento.

De modo geral, os valores médios para as contagens totais e diferenciais dos leucócitos, e contagem de plaquetas, parecem não sofrer influências significativas com o tratamento ou com a evolução da doença. O infiltrado inflamatório e o parasitismo medular parecem não

influenciar negativamente as células precursoras dos leucócitos e plaquetas, como se supõe que ocorra com as hemácias (COSTA VAL, 2004).

Não houve correlação entre os achados de hematologia antes do tratamento e no momento da avaliação e sintomatologia clínica dos animais. Estes resultados contrastam com os dados apresentados por Xavier (2002), que relata que é maior a proporção de animais sintomáticos com alterações no hemograma, do que aqueles que não apresentam sintomas da doença.

Dentre os parâmetros bioquímicos utilizados como marcadores de avaliação da função renal, a dosagem de creatinina não apresentou em momento algum valor acima do fisiológico, ao contrário dos valores das dosagens de uréia, que se apresentaram sempre acima daqueles fisiológicos. Valores altos de uréia sérica indicam que os cães apresentavam nefropatia inicial ou incipiente. Provavelmente, os rins destes animais ainda que competentes para filtrar e eliminar toda a creatinina, estão sofrendo injúrias gradativas pela ação dos imunocomplexos e pela proteinúria, conseqüentes da LVC. A associação concomitante da doença renal com a evolução da LVC já foi relatada por vários autores (BONFANTI & ZATELLI, 2004; COSTA VAL, 2004; ZATELLI, 2004).

A relação A/G é um parâmetro importante e indicativo de prognóstico para os animais. O aumento significativo desta relação, apresentado pelos animais no momento da avaliação, quando comparado com a fase de pré-tratamento, indica melhora na capacidade responsiva do animal aos parasitos. A literatura indica que esta relação tende a ser baixa em cães sintomáticos, devida a hipergamaglobulinemia, que em alguns casos é associada à proteinúria, decorrentes da LVC (ALMEIDA et al., 2006; AMUSATEGUI et al., 2003; COSTA VAL, 2004; REIS et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006). Estes autores sugerem ser alta a correlação entre a relação $A/G \leq 0,6$ e o *status* clínico dos animais. Dos três animais que apresentavam a relação A/G igual a 0,6 na nossa avaliação, dois eram sintomáticos.

De modo geral, dentro da população estudada, os animais apresentaram melhora significativa nos principais parâmetros que são utilizados na rotina de acompanhamento ao tratamento de LVC, ou seja: na avaliação clínica; sorológica; imuno-histoquímica de biópsia pele de orelha; e nos parâmetros hematológicos e de bioquímica sérica.

Sob todos os aspectos avaliados é possível afirmar que a maioria cães submetidos ao tratamento com Anfotericina B e protocolo de manutenção com Alopurinol, Vitamina C e Levamizol apresentaram melhora significativa em todos os parâmetros avaliados. Entretanto, a competência para a resposta imune celular, não avaliados neste trabalho, é conhecida como importante tanto para o desenvolvimento da doença, como para a resposta à terapêutica. (PINELLI et al. 1994; RHALEM et al., 1999).

Outro aspecto a se considerar é que até onde se conhece, nenhuma terapia até agora utilizada tem conduzido a completa eliminação dos parasitos. A questão que se coloca é: que capacidade estes animais assintomáticos após o tratamento, que apresentaram resultados negativos para a pesquisa do parasito através da imuno-histoquímica e da PCR, possuem para serem infectantes para os flebotomíneos?

Nosso trabalho não permite concluir a este respeito, pela impossibilidade temporal de realização de xenodiagnóstico nos cães. Entretanto não estamos seguros de que, na eventualidade de tê-lo praticado, responderíamos a esta questão com segurança.

Preferimos acreditar que a associação do tratamento com as medidas de controle centradas no animal seja efetivamente bloqueadora da transmissão do parasito, considerando as evidências positivas para a recomendação do seu uso (DAVID et al., 2001; FOGLIA MANZILLO et al., 2006; MAROLI et al., 2001; MAROLI, 2002; MIRÓ et al., 2006 *in press*; OLIVEIRA-LIMA, 2002; REITHINGER et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005).

Este trabalho é pioneiro ao avaliar de forma sistematizada animais submetidos a um protocolo terapêutico para LVC no contexto rotineiro de uma clínica veterinária de referência em Belo Horizonte. Este contexto vai além da administração e prescrição de medicamentos. Envolve o bem-estar animal, representado pelo convívio junto aos proprietários durante todo o processo; participação responsável destes últimos, através da adoção de medidas profiláticas, não só diretamente no animal, como também no ambiente em que vive o mesmo; e por último, o envolvimento ético do médico veterinário em todas as fases do tratamento, que o torna uma ferramenta útil na educação para a saúde dos proprietários de cães acometidos por LV, com orientações sobre prevenção e transmissão da doença.

Outros trabalhos devem ser conduzidos em cães tratados rotineiramente para LV em clínicas veterinárias de Belo Horizonte, e outras cidades do Brasil. São necessários novos estudos, que acompanhem os cães tratados por um período de tempo maior; que estudem a resposta imune celular e a capacidade infectante destes animais para o inseto vetor; além dos parâmetros avaliados neste estudo. A interpretação destes resultados e o trabalho em parceria com os órgãos de Saúde Pública podem permitir respostas que auxiliem no entendimento e no controle da leishmaniose visceral, doença que anualmente acomete milhares de pacientes humanos e caninos no Brasil.

CONCLUSÕES

10 – CONCLUSÕES

- ✓ O tratamento da LVC com o protocolo que inclui Anfotericina B na dose de 0,6mg/kg, em 16 aplicações a cada 72 horas e manutenção com uso constante de Alopurinol (20mg/kg) a cada 12 horas, 500mg de Vitamina C a cada 12 horas e 0,5mg/kg de Levamizol a cada 48 horas, determinou melhora significativa nos parâmetros que são utilizados na rotina de acompanhamento dos animais.
- ✓ O número de animais submetidos ao tratamento da LVC é pequeno em relação aos animais soropositivos atendidos em Clínica Veterinária de referência para o tratamento em Belo Horizonte.
- ✓ O aumento significativo do número de cães com resultado negativo nos testes de imuno-histoquímica e PCR de pele de face interna de orelha no momento em que foram avaliados, é indicativo de que o protocolo terapêutico avaliado neste trabalho induziu a redução da carga parasitária neste tecido.
- ✓ Pelo número de animais submetidos ao tratamento e pelo rígido protocolo a que são submetidos, incluindo medidas de controle da infecção centrada nos animais, acreditamos que o risco de permanência destes animais em área endêmica para LVC é minimizado, considerando a situação de transmissão do município de Belo Horizonte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUZA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasitol.*, v. 127 (3-4), p. 227-232, 2005.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.*, v. 22, n.12, p. 552-557, 2006.
- ALVAR, J., CAÑAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., NIETO, J. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v. 57, p. 1-87, 2004.
- ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRÉS, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; SAN ANDRÉS, M. D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SÁINZ, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 88, n. 0, p. 1-8, 1994.
- ALVAR, J.; CRUZ, I.; MORALES, M. A.; CAÑAVATE, C. Molecular biology tools in leishmaniasis diagnosis and epidemiology. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sevilha: [s.n.], 2002, p. 25-30.
- ALVES, W. Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. *Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas*. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, 2006. p. 94-98.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad. Saúde Pública*, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÍGUEZ F.; TESOURO M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur. J. Epidemiol.*, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.
- ASHFORD, D. A.; DAVID J. R. ; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO M. C.; SAMPAIO D. P.; BADARO R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 59. p. 53-57, 1998.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3^a ed. Canada: Saunders Elsever, 2006. cap. 73, p. 685-698.
- BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, v. 106, p. 315-314, 2002.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.

BIANCIARDI, P.; FASANELLA, A.; MANZILLO, V. F.; TROTTA, T.; PAGANO, A., SORINO, S.; GRADONI, L.; OLIVA, G. The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. *Parasitol. Res.*, v. 93, n. 6, p. 486-492, 2004

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

BORJA-CABRERA, G. P.; CRUZ MENDES, A.; PARAGUAI DE SOUZA, E. ; OKADA, L. Y. H.; TRIVELLATO, F. A.; KAWASAKI, J. K. A.; COSTA, A. C.; REIS, A. B.; GENARO O.; BATISTA, L. M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, v. 22, n. 17-18, p. 2234-2243, 2004.

BUTLER, P. G. Levamisole therapy of chronic *Leishmania tropica*. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, n. 11, p. 221-224, 1978. Abstract

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I- Origen of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 6, p. 93-100, 1964.

CARCELÉN, J.; GÓMEZ GORDO, L.; INIESTA, V.; MOLANO, I.; CORRALIZA, I.; MANGAS, M.; SÁNCHEZ, J.; MONROY, I.; GÓMEZ NIETO, L.C. Casos sobre la variabilidad clínica y lesional de la leishmaniosis canina. *Centro Veterinario – Rev. de la Asoc. Madrileña de Veterinarios de Animales de Compañía*, maio-junho, p. 4-16, 2005.

CARDOSO, L.; CABRAL, M. *Leishmania* e leishmaniose canina. *Rev. Port. Ciên. Vet.*, n. 13, p. 121-141, 1999.

CORTADELLAS, O. Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 17, n. 6, p. 808-812, 2003.

CASTRO-SOUSA, F.; PARANHOS-SILVA, M.; SHERLOCK, I.; PAIXÃO, M. S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. C. Dissociation between vasodilation and *Leishmania* infection-enhancing effects of sand fly saliva and maxadilan. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, n.7, p. 997-999, 2001.

COSTA, C. H.; VIEIRA, J. B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.*, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

COSTA VAL, A. P. *Tratamento da Leishmaniose Visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas*. 2004. 125p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

CUPOLILLO, E. Avanços dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. *Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas*. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, 2006. p. 58-62.

CURI, N. H.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, n.1, p. 99-101, 2006.

DA SILVA, E. S.; VAN DER MEIDE, W. F.; SCHOONE, G. J.; GONTIJO, C. M.; SCHALLIG, H. D.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet. Res. Commu.*, v. 30, n. 6, p. 637-643, 2006.

DA SILVA V.,O., BORJA-CABRERA, G.,P.; CORREIA PONTES, N., N.; DE SOUZA, E., P.; LUZ, K., G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C., B. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *vaccine*, v. 19, n. 9-10, p. 1082-1092, 2001.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, n. 48, v. 3, p. 151-156, 2006.

DAVID, J. R.; STAMM, L. M.; BEZERRA, H. S.; SOUZA, R. N.; KILLICK- KENDRICK, R.; LIMA, J. W. O. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent antifeeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, n.6, p. 839-847, 2001.

DAY, M. J. Implications of the immune system during infection by *Leishmania* organism in canine. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS, 1., 2004, Nápoles. *Abstract book of the International congress on canine leishmaniasis*, Nápoles: [s.n.], 2004. p. 21-28.(a)

DAY, M. J. The canine immune system and therapy of leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS, 1., 2004, Nápoles. *Abstract book of the International congress on canine leishmaniasis*, Nápoles: [s.n.], 2004. p. 29-35. (b)

DEANE, L., M. Leishmaniose visceral no Brasil – estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. 1ª ed. Rio de Janeiro: Serviço nacional de educação sanitária , 1956, 161 p.

DE FREITAS, E.; MELO, M. N.; COSTA VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet. Parasitol.*, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, 2006.

DE LUNA, R.; FERRANTE, M.; SEVERINO, L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; GRADONI, L.; LUCISANO, A.; PERSECHINO, A. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis associated anaemia. *J. Comp. Path.*, v. 122, n. 2-3, p. 213-216, 2000.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp.Immunol. Microbiol. Infect. Dis*, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

Di BARTOLA, P. S. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da afecção renal. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de medicina interna veterinária. Moléstias do cão e do gato. 4ª ed. São Paulo: Manoli Ltda, 1997. v. 2, cap. 132, p. 2355-2373.

DIETZE, R.; BARROS G. B.; TEIXEIRA L.; HARRIS J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin. Infect. Dis.*, v. 25, p. 1240-1242, 1997.

DUNN, J. K. Introdução à resolução de problemas médicos. In: DUNN, J. K. Tratado de medicina de pequenos animais. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2001. cap. 1, p. 4-12.

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

ELKHOURY, A. N. S. M. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. *Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas*. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, 2006. p. 24-26.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: AN UPDATE, 1., 1999, Barcelona. *Proceedings of the international canine leishmaniasis forum*. Barcelona: [s.n.], 1999. p. 6-10.

FERRER, L. M. The pathology of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sevilha: [s.n.], 2002, p. 21-24.

FOGLIA MANZILLO, V.; OLIVA, G.; PAGANO, A.; MANNA, L.; MAROLI, M.; GRADONI, L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 142, n. 1-2, p. 142-145, 2006.

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

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. Hemograma. In: GARCIA-NAVARRO, C. E. K. Manual de hematologia veterinária. 2ª ed. rev. ampl. São Paulo: Varela, 2005. cap. 5. p. 79-99.

GIMÉNEZ, A. A.; La Leishmaniosis canina. 2ª Parte. Modelos radiográficos de las lesiones óseas y articulares en la leishmaniosis canina. *Inf. Vet. Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España*, setembro, p. 34-38, 2005.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M., N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 7, n. 3, p. 338- 349, 2004.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sevilha: [s.n.], 2002, p. 7-14.

GRIMA, M. Z. La Leishmaniosis canina. 1ª Parte. Panorâmica general de la enfermedad. *Inf. Vet. Revista oficial del consejo general de colegios veterinários de Español*, junho, p.14-18, 2005.

JOÃO, A.; PEREIRA, M. A.; CORTES, S.; SANTOS-GOMES, G. M. Canine Leishmaniasis Chemotherapy: Dog's clinical condition and risk of *Leishmania* transmission. *J. Vet. Med.*, v. 53, n. 10, p. 540-545, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sevilha: [s.n.], 2002, p. 57-69, 2002.

KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. Clinical aspects of canine leishmaniasis in Greece In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS, 1., 2004, Nápoles. *Abstract book of the International congress on canine leishmaniasis*, Nápoles: [s.n.], 2004. p. 51-57.

KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L.; POLIZOPOULOU, Z.; BILLINIS, C.; ARGYRIADIS, D.; DIAKOU, N.; PAPADOPOULOS, O. A randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, v. 98, n. 4, p. 247-261, 2001.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. 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.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in biology and medicine, v. 1. 1^a ed. Londres: Academic Press, 1987. cap. 7, p. 291-364.

LAISON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAMOTHE, J. Treatment of canine leishmaniasis from A (Amphotericin B) to Z (Zyloric®). In: CANINE LEISHMANIASIS: AN UPDATE, 1., 1999, Barcelona. *Proceedings of the international canine leishmaniasis forum*. Barcelona: [s.n.], 1999. p. 12-17.

LAMOTHE, J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.*, v. 42, n.4, p. 170-175, 2001.

LAMOTHE, J. An open clinical trial with amphotericin B treated by heat in canine leishmaniasis. Setembro, 2002. Disponível em: <http://www.leishmania.org/old_new0.asp#amphoB_calore> Acesso em 29 de dezembro de 2006.

LAMOTHE, J. Long term follow-up of 41 dogs with leishmaniasis treated by amphotericin B then allopurinol alone. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS, 1., 2004, Nápoles. *Abstract book of the International congress on canine leishmaniasis*, Nápoles: [s.n.], 2004. p. 92-93.

LAVERAN, A. Les leishmanioses chez les animaux. *Ann. L'institut Pasteur*, novembro-dezembro, n. 11-12, p. 885-912, 1914.

- LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 68, n.2, p. 151-162, 2005.
- LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta trop.*, v. 92, p. 43-53, 2004.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; LEWIS FARR, A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.
- MARGONARI, C.; FREITAS, C. R.; RIBEIRO, R. C.; MOURA, A. C. M.; TIMBÓ, M.; GRIPP, A. H.; PESSANHA, J. E.; DIAS, E. S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 1, p. 31-38, 2006.
- MAROLI, M.; MIZZONI, V.; IRAGUSA, C. S.; D'ORAZI, A. ; GRADON, L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med. Vet. Entomol.*, v. 15, n. 4, p. 358-363, 2001.
- MAROLI, M. The control of canine leishmaniasis with Scalibor[®] ProtectorBands in southern Italy: pilot field studies. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sevilha: [s.n.], 2002, p. 81-86.
- MAURICIO, I. L.; GAUNT, M. W.; STODARD, J. R.; MILES, M. A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology*, v. 122, p. 393-403, 2001.
- MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today*, v. 16, n. 5, p. 189, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília, Brasil, 120 p., 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Indicadores de morbidade e fatores de risco. Brasil, 2005. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2004/d0205.def> > Acesso em 10 de dezembro de 2005(a).
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Posição oficial do Ministério da Saúde quanto ao tratamento da LVC. Nota técnica. Brasil, 2005. Disponível em: < http://portalweb02.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lvc_nota_tecnica.pdf -> Acesso em 12 de dezembro de 2005(b).
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Uso de antimoniato de meglumina em cães. Nota técnica. Brasil, 2004. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21284 > Acesso

em 29 de dezembro de 2006.

MIRÓ, G.; GÁLVEZ, R.; MATEO, M.; MONTOYA, A.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet. Parasitol.*, 2006. Article in press

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

MIRÓ, G.; MATEO, I.; CAÑAVATE, C.; NIETO, J.; MONTOYA, A.; GALY, S.; MÉDAILLE, C.; ALVAR, J. Miltefosine: A new treatment for canine leishmaniosis – Preliminary results. In: WORLDLEISH, 3., 2005, Palermo-Terrasini. *Abstract book of Third World Congress on Leishmaniosis*. Sicília: [s.n.], 2005. p. 171.

MOREIRA, E.D.; DE SOUZA, V.M.M.; CARVALHO, L.P. Optimized dog-culling
Optimized dog-culling program does not reduce *Leishmania* infection in children in an endemic area: results of a community-based trial. In: WORLDLEISH, 3., 2005, Palermo-Terrasini. *Abstract book of Third World Congress on Leishmaniosis*. Sicília: [s.n.], 2005. p. 229.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZÁLES, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVAR, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet. Immuno. Immunopathol.*, v. 71, n. 3-4, p. 181-195, 1999.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.*, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MORITZ, A.; STEUBER, S.; GREINER, M. clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis. *Tokai J. Exp. Clin. Méd.*, v. 23, n. 3, p. 279-283, 1999.

NIETO, J.; SAUGAR, J. M.; MIRET, J.; GONZÁLES, F. La Leishmaniosis canina. 1ª Parte. Terapéutica. *Inf. Vet. Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España*, junho, p. 34-40, 2005.

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

OLIVA, G.; GRADONI, L.; CIAMARELLA, P.; DE LUNA, R.; CORTESE, L.; ORSINI, S.; DAVIDSON, R. N.; PERSECHINO, A. Activity of liposomal amphotericin b (Ambisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 35, n. 6, p. 1013-1019, 1995.

OLIVEIRA, F. S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M. Q.; BRAZIL R. P.; PACHECO, R. S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 129, n. 3-4, p.219-227, 2005.

OLIVEIRA-LIMA, J. W. Preliminary results of a field trial to evaluate deltamethrin-impregnated dogs collars for the control of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sevilha: [s.n.], 2002, p. 91-96.

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.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1., 2005, Brasília. *Informe final de la reunión de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral en las Américas*, Rio de Janeiro: Organización Panamericana de la salud, 2006. 150 p.

PIARROUX, R.; AZAIEZ, R.; LOSSI, A. M.; REYNIER, P.; MUSCATELLI, F.; GAMBARELLI, M.; FONTES, M.; DUMONT, H.; QUILICI, M. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 49, n. 3, p. 364-369, 1993.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.*, v. 64, n. 1, p. 229-235, 1994.

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

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

PETIT, C.; YARDLEY, V.; GABORIAU, F.; BOLARD, J.; CROFT, S. L. Activity of heat-induced reformulation of amphotericin B deoxycholate (Fungizone) against *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, n. 2, p. 390-392, 1999.

PREFEITURA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE. Vigilância Epidemiológica da leishmaniose visceral no município de Belo Horizonte. Disponível em: <http://portal1.pbh.gov.br/pbh/index.html?id_conteudo=11580&id_nivel=1&ver_servico=N> Acesso em 20 dezembro 2006.

POLI, A.; SOZZI, S.; GUIDI, G.; BANDINELLI P.; MANCIANTI F. Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v. 71, p. 263-271, 1997.

RAINA, P.; WALTER-TOEWDS, D.; BONNETT, B.; WOODWARD, C.; ABERNATHY, T. Influence of companion animals on the physical and psychological health of older people: an analysis of a one-year longitudinal study. *J. Am. Geriatr. Soc.*, v. 47, n. 3, p. 323-329, março 1999.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. G.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immuno. Immunopathol.*, v. 112, n. 3-4, p. 102-116, 2006.

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

OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

REITHINGER, R.; COLEMAN, P. G.; ALEXANDER, B.; VIEIRA, E. P.; ASSIS, G.; DAVIES, C. R. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil?. *Intern. J. Parasitol.*, v. 34, n. 1, p. 55-62, 2004.

REZAI, H. R.; BEHBEHANI, A. B.; GETTNER, S.; ARDEHALI, S. Effect of levamisole on the course of experimental leishmaniasis in guinea-pigs and mice: haematological and immunological findings. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 82, n. 3, p. 243-249. 1998. Abstract

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASN, S.; JAFFE, C. L. Analysis of immune responses in dogs with canine leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet. Immuno. Immunopathol.*, v. 71, n. 1, p. 69-76, 1999.

RIBEIRO, V. M.; RABELO, R. C.; MACHADO, P. M. P.; MICHALICK, M. S. M. Leishmaniose visceral canina: avaliação clínica e laboratorial de um cão naturalmente infectado submetido a tratamento com Glucantime®. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 19., 1997, Curitiba. *Anais do XIX Congresso brasileiro de clínicos veterinários de pequenos animais*. Curitiba: Associação nacional de clínicos veterinários de pequenos animais-Paraná, 1997. p. 8.

RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S. M.; XAVIER, S. C.; TAFURI, W. L. Alternativa para tratamento de cães idosos e/ou portadores de insuficiência renal crônica acometidos de leishmaniose visceral e a infectividade da pele destes animais durante o tratamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 20., 1999, Águas de Lindóia. *Anais do XX Congresso brasileiro de clínicos veterinários de pequenos animais*. São Paulo: Associação nacional de clínicos veterinários de pequenos animais-São Paulo, 1999. p. 27.

RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S. M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. *Nosso clínico*, n. 24, nov/dez, p. 10-20, 2001.

RIBEIRO, V. M.; CHIARELLI, I. M.; XAVIER, S. C.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. Padrão histológico e infectividade da pele de cães com leishmaniose visceral antes e durante tratamento com antimonialato de n-metilglucamina (Glucantime®) e alopurinol. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS E REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM LEISHMANIOSES, 17/6., 2002, Uberaba. *Programa e resumos da XVII Reunião anual de pesquisa aplicada em doença de chagas e VI Reunião anual de pesquisa aplicada em leishmanioses*. Uberaba: [s.n.], 2002. p. 63.

RIBEIRO, V. M.; RAJÃO, R. A.; DE ARAÚJO DINIZ, S.; MICHALICK, M. S. M. Evaluation of the potential transmission of visceral leishmaniasis in a canine shelter. *Rev. Méd. Vet.*, v. 156, n. 1, p. 20-22, 2005.

RIBEIRO, V. M. Tratamento da LV canina e seu impacto na incidência de LV humana e na prevalência da LV em cães. Uma experiência em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS

AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. *Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas*. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, 2006. p. 104-107.

RIBEIRO, V. M.; MACIEL JR., B. S.; SOUZA, A. A.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. Histopatologia e amastigotas na pele de cães com leishmaniose e a fração albumina/globulinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 27., 2006, Vitória. *Anais do XXVII Congresso brasileiro de clínicos veterinários de pequenos animais*. Vitória: Associação nacional de clínicos veterinários de pequenos animais-Espírito Santo, 2006. p. 66.

ROSARIO, E. Y., GENARO O.; FRANÇA-SILVA, J. C. DA COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; REIS, A. B. ; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

SACKS D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 55, p. 453-483, 2001.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.*, v. 90, p. 655-656, 1993.

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

SCHETTINI, D. A.; COSTA VAL, A. P.; SOUZA, L. F.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O. G. F.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARD F. Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposomeencapsulated meglumine antimoniate. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 38, n. 12, p. 1879-1883, 2005.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. Frequência de casos confirmados por agravo e semana epidemiológica 50/2006. Disponível em: < <http://www.saude.mg.gov.br:8180/saude/viewController.jsp?page=178> > Acesso em 20 de dezembro de 2006.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 65, n. 6, p. 896-898, 2001.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PACHECO R. S.; FIUZA, V. O.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SILVA, A.V.M.; DE PAULA, A. A.; CABRERA, M A. A.; CARREIRA, J. C. A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Cad. Saúde Pública*, v.21, n. 1, p. 324-328, 2005.

SILVEIRA, F. T.; LAISON, R.; CORBETT, C. E. P. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous

leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 5, p. 525-534, 2005.

SOLANO-GALLEGU, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J. Comp. Path.*, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGU, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGU, M.; VALLADARES, J. E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J., FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.*, v. 96, n. 4, p. 265-276, 2001.

SOLANO-GALLEGU, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.*, v. 90, n. 1-2, p. 37- 45, 2000.

TAFURI, W. L.; MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M.; GENARO, O.; LEITE, V. H. R.; BARBOSA, A. J. A.; BAMBIRRA, E. A.; DA COSTA, C. A.; MELO, M. N.; MAYRINK, W. Optical and electron microscopical studies of canine kidney naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Trop. S. Paulo*, v. 31, n. 3, p. 139-145, 1989.

TAFURI, Wg. L.; MICHALICK, M. S. M.; RIBEIRO, V. M. Avaliação clínica, sorológica e infectividade da pele em um cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, antes e durante tratamento com antimonial (Glucantime®) e allopurinol (Zylorick). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 20., 1999, Águas de Lindóia. *Anais do XX Congresso brasileiro de clínicos veterinários de pequenos animais*. São Paulo: Associação nacional de clínicos veterinários de pequenos animais-São Paulo, 1999. p. 28.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods*, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

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

VALLADARES, J. E.; RIERA, C.; GONZÁLES-ENSENYAT, P.; DÍEZ-CASCÓN, A.; RAMOS, G.; SOLANO-GALLEGU, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniasis using a antimony liposomal formulation. *Vet.Parasitol.*, v. 97, n.1, p. 15-21, 2001.

VERCAMMEN, F.; FERNANDEZ-PEREZ, F. J.; AMO, C.; ALUNDA, J. M. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and western blot. *Acta Trop.*, v. 84, n. 3, p. 175-181, 2002.

VEXENAT, J. A.; OLLIARO, P. L.; FONSECA DE CASTO, J. A.; CAVALCANTE, R.; FURTADO CMPOS, J. H.; TAVARES, J.P.; MILES, M.A. Clinical recovery and limited

cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidina (paromomycin). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 58, n. 4, p. 448-453, 1998.

VOLLER, A., BIDWELL, D. E.; BARLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. World Health Organ.*, v. 53, n. 1, p. 55-65, 1976.

VOULDOUKIS, I.; ROUGIER, S.; DUGAS, B.; PINO, P.; MAZIER, D.; WOEHRLE, F. Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet. Parasitol.*, v. 135, n. 2, p. 137-146, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em < <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en> > Acesso em 01 dezembro 2005.

XAVIER, S. C. *Aspectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2002. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

XAVIER, S. C.; DE ANDRADE, H. M.; MONTE, S. J.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet. Res.*, v. 2, p. 1-17, 2006.

ZATELLI, A. The nephropatic leishmaniotic patient. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS, 1., 2004, Nápoles. *Abstract book of the International congress on canine leishmaniasis*, Nápoles: [s.n.], 2004. p. 83-85.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A: Aprovação do CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 92/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação clínica, laboratorial e parasitológica de cães acometidos por Leishmaniose Visceral, submetidos a um mesmo protocolo terapêutico em uma clínica veterinária de Belo Horizonte e mantidos em domicílio**", que tem como responsável **Marilene Suzan Marques Michalick**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 11/2006**.

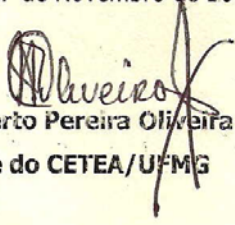
Este certificado expira-se em **22/ 11 / 2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 92/2006**, related to the project entitled "**Clinical, laboratorial and parasitological evaluation of dogs with Visceral Leishmaniasis and submitted to one exactly therapeutical protocol in one veterinary clinic of Belo Horizonte, Minas Gerais**", under the supervision of **Marilene Suzan Marques Michalick**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 22, 2006**.

This certificate expires in **November 22, 2011**.

Belo Horizonte, 27 de Novembro de 2006.



Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 -- Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetico/cetea - cetea@prp.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO B: Termo de anuência

DECLARAÇÃO

Declaro estar de acordo que o meu cão _____, seja examinado (a) pelo Médico Veterinário Dr. Sydnei Magno da Silva, CRMV-MG N° 6281, sob a supervisão do Médico Veterinário Dr. Vitor Márcio Ribeiro, CRMV-MG N° 1883. As amostras coletadas pela Clínica Veterinária Santo Agostinho para exames complementares ao diagnóstico poderão ser utilizadas também para pesquisa e os resultados incluídos em dissertação intitulada: “Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*, submetidos a um protocolo terapêutico em uma clínica veterinária de Belo Horizonte” do curso de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Não será revelado o nome do animal. Será guardado absoluto sigilo quanto aos dados pessoais de seu proprietário para todos os efeitos legais.

Fui cientificado ainda, que a qualquer momento posso solicitar a exclusão do animal desta pesquisa.

Belo Horizonte, ____ / ____ / 200__.

Nome completo: _____

Assinatura: _____

Documento de Identidade: _____

ANEXO C: Ficha de avaliação clínica

FICHA CLÍNICA Nº: _____

DATA: _____

NOME DO PROPRIETÁRIO: _____

NOME DO PACIENTE: _____ PESO: _____

TEMPERATURA: _____ PULSO: _____ FREQ. RESPIRATÓRIA: _____

	NORMAL:	ANORMAL:	N.E:
1. APARÊNCIA GERAL:	☐	☐	☐
2. ATITUDE:	☐	☐	☐
3. LOCOMOÇÃO:	☐	☐	☐
4. CABEÇA E FACE:	☐	☐	☐
4.1. OLHOS:	☐	☐	☐
4.2. ORELHAS:	☐	☐	☐
4.3. NARIZ:	☐	☐	☐
5. CAVIDADE ORAL:	☐	☐	☐
5.1. MEMBRANA MUCOSA:	☐	☐	☐
5.2. GENGIVA:	☐	☐	☐
5.3. DENTES:	☐	☐	☐
5.4. TONSILAS:	☐	☐	☐
6. LINFONODOS :	☐	☐	☐
7. TEGUMENTO:	☐	☐	☐
8. ARTICULAÇÕES MÚSCULO-ESQUELÉTICAS:	☐	☐	☐
8.1. OSSOS:	☐	☐	☐
8.2. MÚSCULOS:	☐	☐	☐
9. PERÍNEO:	☐	☐	☐
9.1. ÂNUS:	☐	☐	☐

9.2. VULVA/TESTÍCULOS:	☐	☐	☐
9.3. GLÂND. MAMÁRIAS/PÊNIS:	☐	☐	☐
9.4. PRÓSTATA:	☐	☐	☐
10. CAVIDADE ABDOMINAL:	☐	☐	☐
11. SISTEMA RESPIRATÓRIO:	☐	☐	☐
12. SISTEMA CARDIOVASCULAR:	☐	☐	☐
13. SISTEMA NERVOSO:	☐	☐	☐

DIAGNÓSTICO, EXAMES COMPLEMENTARES, TRATAMENTO E COMENTÁRIOS.

This image shows a full page of blank handwriting practice paper. It features multiple sets of horizontal lines across the entire page. Each set consists of three lines: a solid top line, a dashed middle line, and a solid bottom line. These sets are repeated vertically down the page, providing a guide for letter height and placement. The background is white, and the lines are black. There is no text or other markings on the page.

NOME DO ANIMAL :

DIA:

ACHADOS MAIS FREQUÊNTES EM CÃES COM LVC, SEGUNDO ALVAR et al.(2004)
E AMUSATEGUI et al. (2003):

	PRESENTE	AUSENTE	N.O./N.R.
1. LINFOADENOPATIA:	☐	☐	☐
1.1 GENERALIZADA:	☐	☐	☐
1.2 LOCALIZADA:	☐	☐	☐
1.2.1 LINF. SUBMANDIBULAR:	☐	☐	☐
1.2.2 LINF. PRÉ-ESCAPULAR:	☐	☐	☐
1.2.3 LINF. POPLÍTEO:	☐	☐	☐
2. ANORMALIDADES LOCOMOTORAS:	☐	☐	☐
3. SINAIS VISCERAIS:	☐	☐	☐
3.1 PERDA DE PESO:	☐	☐	☐
3.2 FRAQUEZA:	☐	☐	☐
3.3 ALT. GASTROINTESTINAIS: (VÔMITOS,DIARRÉIAS,MELENA)	☐	☐	☐
3.4 ANOREXIA/ALT. APETITE:	☐	☐	☐
3.5 POLIÚRIA/POLIDPSIA:	☐	☐	☐
3.6 OLIGÚRIA/HEMATÚRIA:	☐	☐	☐
3.7 EPISTAXE:	☐	☐	☐
3.8 UVEÍTES:	☐	☐	☐
3.9 TOSSE:	☐	☐	☐
4. SINAIS CUTÂNEOS:	☐	☐	☐
4.1 ALOPÉCIA:	☐	☐	☐
4.2 DESCAMAÇÃO:	☐	☐	☐
4.3 HIPERPIGMENTAÇÃO:	☐	☐	☐

4.4 ERITEMA:	☐	☐	☐
4.5 PRURIDO:	☐	☐	☐
4.6 ÚLCERAS:	☐	☐	☐
4.7 NÓDULOS:	☐	☐	☐
4.8 PÚSTULAS:	☐	☐	☐
4.9 ONICOGRIFOSE:	☐	☐	☐
4.10 OTITE:	☐	☐	☐
4.11 CONJUNTIVITE:	☐	☐	☐
5. LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES CUTÂNEAS:			
5.1 EM VOLTA DAS ORELHAS/OLHOS:	☐	☐	☐
5.2 FACE:	☐	☐	☐
5.3 MEMBROS:	☐	☐	☐
5.4 GENERALIZADA:	☐	☐	☐
5.5 OUTRAS LOCALIZAÇÕES:	☐	☐	☐

DIAGNÓSTICO, EXAMES COMPLEMENTARES, TRATAMENTO E COMENTÁRIOS.

[illegible]

ANEXO D: QUADRO 3

QUADRO 3

Grupo de cães selecionados, de acordo com a raça, sexo, idade, e sinais clínicos de leishmaniose visceral apresentados ao início do tratamento

Paciente	Raça	Sexo	Idade (Meses)	Sinais clínicos de leishmaniose visceral
1	Daschund	Fêmea	38	Aparência; Linfoadenopatia; Dermatológico; Visceral
2	Fila	Macho	72	Nenhum
3	Labrador	Macho	54	Aparência; Linfoadenopatia; Dermatológico; Visceral
4	Sem Raça Definida	Fêmea	7	Linfoadenopatia; Dermatológico; Outros.
5	Labrador	Fêmea	12	Linfoadenopatia
6	Poodle	Macho	17	Linfoadenopatia

7	Dogo Argentino	Fêmea	12	Aparência; Linfoadenopatia; Dermatológico; Visceral
8	Labrador	Fêmea	22	Dermatológico; Visceral
9	Sem Raça Definida	Fêmea	38	Aparência; Linfoadenopatia; Dermatológico; Visceral; Outros.
10	Labrador	Macho	19	Linfoadenopatia; Dermatológico
11	Daschund	Fêmea	27	Linfoadenopatia; Dermatológico; Outros.
12	Poodle	Macho	13	Aparência; Linfoadenopatia; Dermatológico; Visceral
13	Whippet	Fêmea	23	Linfoadenopatia

14	Pastor Alemão	Fêmea	47	Aparência; Linfoadenopatia; Dermatológico; Visceral
15	Poodle	Fêmea	28	Aparência; Linfoadenopatia; Dermatológico; Outros.
16	Yorkshire	Fêmea	37	Aparência; Linfoadenopatia; Dermatológico; Visceral
17	Sem Raça Definida	Fêmea	244	Linfoadenopatia; Dermatológico
18	Sem Raça Definida	Macho	77	Linfoadenopatia; Dermatológico; Outros.
19	Pastor Canadense	Macho	21	Linfoadenopatia; Dermatológico
20	Rottweiler	Fêmea	45	Linfoadenopatia

21	Schnnauzer	Fêmea	27	Linfoadenopatia; Dermatológico
22	Pit Bull	Fêmea	13	Linfoadenopatia; Dermatológico
23	Pug	Fêmea	18	Visceral; Outros.
24	Labrador	Fêmea	27	Linfoadenopatia; Dermatológico
25	Pit Bull	Macho	19	Linfoadenopatia; Dermatológico
26	Weimaraner	Fêmea	112	Aparência; Linfoadenopatia; Dermatológico; Visceral; Outros.
27	Rottweiler	Fêmea	21	Linfoadenopatia; Dermatológico; Outros.

28	São Bernardo	Macho	23	Linfoadenopatia; Dermatológico
29	Sem Raça Definida	Macho	33	Linfoadenopatia
30	Sem Raça Definida	Macho	44	Aparência; Linfoadenopatia; Dermatológico; Visceral
31	Pastor Alemão	Macho	78	Linfoadenopatia; Dermatológico

ANEXO E: Declaração de responsabilidade

SOLICITAÇÃO PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE

Proprietário: _____
Endereço: _____
Identidade: _____
CPF: _____
Telefone: _____
Nome do animal: _____
Raça: _____
Data de nascimento: _____
Pelagem: _____
Sexo: _____
Idade: _____

Solicito a(o) Dr (a)._____,
da Clínica Veterinária Veterinária Santo Agostinho, a realizar no animal acima identificado, de minha propriedade, todos os procedimentos, clínicos e terapêuticos, objetivando o tratamento da **Leishmaniose Visceral**, declarando ser de minha inteira e livre vontade esta solicitação.

Declaro, neste ato, estar ciente de que a **Leishmaniose Visceral Canina** é uma zoonose e que o tratamento não oferece, em geral, a cura parasitológica. O animal em tratamento necessitará de acompanhamento por toda a vida. Fui devidamente informado dos exames necessários, em intervalos a serem determinados pelo médico veterinário responsável pelo tratamento, para o controle da infecção e da infecciosidade do meu cão.

Também me responsabilizo em adotar todas as medidas prescritas na seqüência do tratamento inicial, conforme orientação médica veterinária, além de adotar as medidas profiláticas de controle do vetor centradas no meu animal e no ambiente em que ele vive, contribuindo para que desta forma ele não represente riscos para a saúde pública.

Caso eu venha a desistir da continuidade do tratamento, encaminharei meu cão para eutanásia com o médico veterinário responsável pelo seu acompanhamento.

Por ser verdade, firmo este documento.

Belo Horizonte, de de 200

Proprietário

Médico Veterinário

ANEXO F: Recomendações ao proprietário

Receita :			Data da Receita :		
Nome do Animal :	Sexo :	Raça :			
Espécie :	Porte :	Idade :	anos e	meses	Peso : Kg
Proprietário :					

RECOMENDAÇÕES

1 - SCALIBOR

- > USO DE CONSTANTE
- > TROCA DE 4/4 MESES
- > OBJETIVO - EVITAR APROXIMAÇÃO DE FLEBÓTOMOS E MATAR OS QUE SE APROXIMAM

2 - PULVEX POUR-ON

- > APLICAÇÃO MENSAL
- > APLICAR UMA AMPOLA NO DORSO NA REGIAO ENTRE AS ESCÁPULAS E OUTRA NA REGIÃO DO QUADRIL
- > OBJETIVO - EVITAR APROXIMAÇÃO DE FLEBÓTOMOS E MATAR OS QUE SE APROXIMAM

3 - NO AMBIENTE - BUTOX

- > DILUIR 1 ML EM 10 LITROS DE ÁGUA
- > APLICAR NAS PAREDES DO CANIL E AMBIENTES EM QUE O ANIMAL PERMANECE POR MAIS TEMPO
- > APLICAÇÃO MENSAL
- > OBJETIVO - MATAR FLEBÓTOMOS NO AMBIENTE E EVITAR CRIADOUROS

4 - CITRONELA

- > PLANTAR NO JARDIM EM ESPAÇOS DE 2 METROS
- > OBJETIVO - REPELIR FLEBÓTOMOS

ESTAS MEDIDAS VISAM PROTEGER O ANIMAL DA APROXIMAÇÃO DE FLEBÓTOMOS E DESTA FORMA PROTEGÊ-LOS DA TRANSMISSÃO OU CONTAMINAÇÃO COM Leishmania.