

7636.089 69  
M 528 e  
1998

Marcia Almeida de Melo

**Ensaio Clínico-Terapêutico na Leishmaniose Visceral  
Canina. Imunoquimioterapia em Animais Assintomáticos**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Minas  
Gerais como requisito parcial  
para a obtenção do grau de  
Mestre em Medicina Veterinária.  
Área: Medicina Veterinária  
Preventiva  
Orientador: Prof. José Oswaldo  
Costa

**U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA**



4369804 0000

OK  
02/03/04

**NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA**

Belo Horizonte  
UFMG-Escola de Veterinária  
1998

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

08/07/98

43698-04

ESCOLA DE VETERINARIA  
BIBLIOTECA  
DA UFMG

0246-68560

M528e Melo, Marcia Almeida de, 1968-

Ensaio clínico-terapêutico na  
leishmaniose visceral canina.  
Imunoquimioterapia em animais  
assintomáticos / Marcia Almeida de Melo. –  
Belo Horizonte : UFMG-Escola de  
Veterinária, 1998.

74p : il.

Dissertação (mestrado)

1. Cão-Doenças-Teses. 2. Calazar-  
Tratamento-Teses. 3. Cão como animal de  
laboratório-Teses.

I. Título.

CDD. 636.708969364

Dissertação defendida e aprovada em 06/02/98. pela Comissão Examinadora constituída por

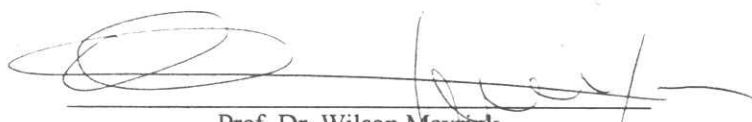
---

Prof. Dr. José Oswaldo Costa  
Orientador



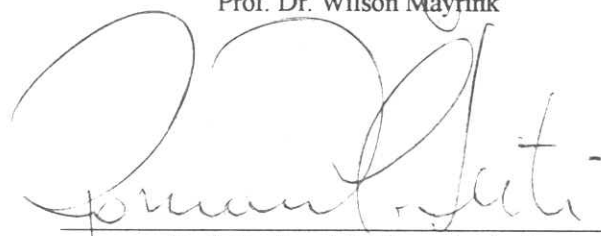
---

Prof. Dr. Odair Genaro



---

Prof. Dr. Wilson Mayrink



---

Prof. Dr. Romário Cerqueira Leite

Aos meus pais, José Irmão,  
Adelina (*in memoriam*),  
Auxiliadora e irmãos, meu  
exemplo de vida, alicerce para  
a minha formação pessoal.

Edisio, minha metade, Lucas e  
Camila, nosso ineiro, impossível  
imaginar-me sem vocês.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Oswaldo Costa pela orientação, pelo carinho e pela sensibilidade em conduzir-me à uma linha de pesquisa diferente da sua.

Ao Prof. Odair Genaro pelo acolhimento em seu laboratório, pelos ensinamentos sempre precisos, pela excelente e competente orientação, amizade e compromisso com a vida acadêmica.

Ao Prof. Wilson Mayrink que, com tantos méritos, conduz os trabalhos com simplicidade e objetividade, meu eterno carinho, respeito e honra em tê-lo como meu co-orientador.

Ao Prof. Carlos Alberto da Costa pela revisão da dissertação e pela contribuição científica.

Ao Veterinário João Carlos França-Silva e o biólogo Roberto Teodoro da Costa, membros do Laboratório de Leishmanioses, pela grande amizade, pela contribuição dada na execução do trabalho e por sempre estarem disponíveis para solucionar problemas inesperados ("pára-quebras").

Ao Departamento de medicina Veterinária da Universidade Federal da Paraíba por conceder-me liberação para a realização do curso e em especial aos Profs. Edisio Oliveira de Azevedo, José Ribeiro Dantas, Verônica Medeiros Trindade, Carlos Enrique Peña Alfaro, Jeferson Azevedo Neto e Sônia Maria de Lima pelo esforço e solidariedade.

Ao Prof. Vicente P.C.P. Toledo pelas primeiras orientações em cultivo celular.

Ao Prof. Ivan Barbosa Machado Sampaio e a Danilo Gonçalves Bastos pela orientação na análise estatística.

Ao Prof. Edisio Oliveira de Azevedo, que como veterinário, colega de instituição e contemporâneos de pós graduação contribuiu tecnicamente para o engrandecimento do trabalho; e como amigo e esposo, soube ser compreensivo e paciente em situações adversas.

Ao Prof Ivon Macêdo Tabosa, amigo, colega de instituição e contemporâneo de pós-graduação, pela participação e ensinamentos na histopatologia.

À Evenilde Picardi Faria pela amizade e apoio na patologia clínica.

Aos colegas de pós-graduação da Parasitologia Alexandre Barbosa Reis, Túlio César da Costa e Héliida Monteiro de Andrade Carvalho pela amizade e troca de conhecimentos.

Aos colegas de pós-graduação da Escola de Veterinária Wany, Brasilina, Santa Rosa, Éricka, Elza, Geraldo Márcio, Rita, Magda/Loa, Joely, Regina, Adalgiza, Eliane e Cristina pelo convívio fraterno.

Aos funcionários e bolsistas do Laboratório de Leishmanioses, Elaine Matias Amaral, Elenice Matias Amaral, Alisson Geraldo Rodrigues de Moraes, Zuleika de Vasconcelos Paiva, Floriano de Souza Oliveira e Isabel Cristina Richard pela amizade, apoio e saudável convivência.

Aos bioteristas Adão Camilo Machado e Weder Gomes de Oliveira pelo profissionalismo e carinho com que cuidaram dos nossos animais.

Aos amigos Pedro/Simone, Roberto/Oneide, Miro/Dica, Auro/Silvana, Amilton/Cris, Ivon e Cristiano, nação nordestina, que em momentos de desânimo aliviavam a saudade por estar longe de casa.

À todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

	Pág
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	13
RESUMO	15
INTRODUÇÃO	17
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	67
SUMMARY	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pag.
TABELA I.	Resultado da média dos diâmetros do teste intradérmico de Montenegro, parasitismo e reação de imunofluorescência 450 dias pós-infecção.	47
TABELA II.	Resultado do exame parasitológico de medula (esfregaço e cultura) durante o experimento	48
TABELA III.	Resultado do parasitológico de baço, fígado, linfonodos poplíteo e mesentérico, orelha e nariz em lâminas de histopatologia 450 dias pós-infecção.	49
GRÁFICO 1.	Reação de imunofluorescência indireta em cães inoculados experimentalmente e tratados contra <i>L. chagasi</i>	50
GRÁFICO 2.	Ensaio imunoenzimático (ELISA) em cães inoculados experimentalmente e tratados contra <i>L. chagasi</i>	51
FIGURA 3a.	Teste Rápido Anticorpo <i>Leishmania donovani</i> do animal 81 do grupo A.	52
FIGURA 3b.	Teste Rápido Anticorpo <i>Leishmania donovani</i> do animal 78 do grupo B.	53
FIGURA 3c.	Teste Rápido Anticorpo <i>Leishmania donovani</i> do animal 85 do grupo C.	54
FIGURA 3d.	Teste Rápido Anticorpo <i>Leishmania donovani</i> do animal 41 do grupo D.	55
GRÁFICO 4.	Resposta proliferativa de linfócitos em cães	56

inoculados experimentalmente e tratados  
contra *L. chagasi*

GRÁFICO 5.	Valor médio de hemácias em cães inoculados experimentalmente e tratados contra <i>L. chagasi</i> .	57
GRÁFICO 6.	Valor médio de leucócitos em cães inoculados experimentalmente e tratados contra <i>L. chagasi</i> .	58
GRÁFICO 7.	Valor médio da aspartato aminotransferase em cães inoculados experimentalmente e tratados contra <i>L. chagasi</i> .	59
GRÁFICO 8.	Valor médio da alanino aminotransferase em cães inoculados experimentalmente e tratados contra <i>L. chagasi</i> .	60
GRÁFICO 9.	Valor médio da creatinina em cães inoculados experimentalmente e tratados contra <i>L. chagasi</i> .	61
GRÁFICO 10.	Valor médio da proteína total em cães inoculados experimentalmente e tratados contra <i>L. chagasi</i> .	62
GRÁFICO 11a.	Valores das frações protéicas do grupo A tratado com imunoterapia contra <i>L. chagasi</i> .	63
GRÁFICO 11b.	Valores das frações protéicas do grupo B tratado com quimioterapia contra <i>L. chagasi</i> .	64
GRÁFICO 11c.	Valores das frações protéicas do grupo C tratado com imunoquimioterapia contra <i>L. chagasi</i> .	65
GRÁFICO 11d.	Valores das frações protéicas do grupo D controle.	66

## RESUMO

Palavras-chave: tratamento, imunoterapia, cão, leishmaniose visceral.

As drogas disponíveis para o tratamento da leishmaniose visceral humana não promovem, até o momento, a cura no cão. Desta forma, enquanto novas drogas não estão disponíveis é necessário que ensaios terapêuticos com drogas antigas sejam testados. O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência terapêutica do glucantime associado ou não a um extrato antigênico de *Leishmania braziliensis* no tratamento de cães assintomáticos inoculados experimentalmente. 32 cães, sem raça definida, foram inoculados com amastigotas de *L. chagasi* e monitorados durante 450 dias. A avaliação dos animais foi feita pela detecção de anticorpos específicos, imunidade celular, hematologia, bioquímica sérica e exame parasitológico da medula e pele. Confirmada a infecção, por sorologia e/ou parasitológico, os animais foram divididos em quatro grupos de oito animais que receberam os seguintes tratamentos: Grupo A, antígeno de *Leishmania* (500 µg/dia); Grupo B, antimônio (100 mg/Kg/dia); Grupo C, associação do antígeno e do antimônio; Grupo D, controle. Com 450 dias pós infecção, os cães foram sacrificados e o parasito pesquisado em esfregaço por aposição e/ou histopatologia de medula, linfonodos poplíteo e mesentérico, baço, fígado, ponta de nariz e orelha. Fragmentos de baço foram cultivados em meio NNN/LIT. Treze cães apresentavam-se parasitados. O antimônio foi capaz de reduzir os níveis de anticorpos e o parasitismo no cão, porém não promoveu a cura.

## 1.INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma zoonose com ampla distribuição geográfica, tendo sido registrada em 88 países ou territórios (21 no Novo Mundo e 67 no Velho Mundo), com grande diversidade epidemiológica. É causada por um protozoário do Gênero *Leishmania*, pertencente à Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida. Cerca de 20 espécies infectam o homem provocando manifestações clínicas multifacetadas (DESJEUX, 1996).

A doença causada por parasitos deste gênero pode ser dividida em duas categorias: leishmaniose tegumentar o qual apresenta sinonímias como, por exemplo, botão de Aleppo, botão do oriente; e leishmaniose visceral, conhecida como calazar, uma doença crônica e frequentemente fatal para o homem e o cão (LONGSTAFFE & GUY, 1985).

Tem sido admitido uma incidência anual no mundo de cerca de 400.000 casos humanos (300.000 de leishmaniose cutânea e 100.000 de leishmaniose visceral), uma prevalência de 12 milhões de casos e uma população de risco estimada de aproximadamente de 350 milhões (WHO..., 1988).

As formas viscerais mais graves são aquelas causadas pela *L. donovani* (Índia), *L. infantum* (Mediterrâneo e Ásia) e *L. chagasi* (América Central e do Sul) (LONGSTAFFE et al, 1983).

A doença é transmitida ao homem e animais por vetores do gênero *Lutzomyia*, Díptera, Phlebotominae, no Novo Mundo, e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Cerca de 30 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados (DESJEUX, 1996).

Os canídeos domésticos e selvagens são os hospedeiros reservatórios mais importantes no Mediterrâneo, China, Brasil e Ásia sendo responsáveis pela transmissão zoonótica da leishmaniose visceral (KEENAN, 1984).

No Brasil, em áreas endêmicas, a leishmaniose visceral canina ocorre simultaneamente com a doença humana, sendo a canina de prevalência mais alta precedendo geralmente a ocorrência no homem (ALENCAR, 1978). Do ponto de vista epidemiológico, o cão apresenta uma maior importância pois muitos animais assintomáticos, em áreas endêmicas, apresentam o parasita na pele. MARZOCHI (1985) ao caracterizar cepas de *Leishmania* isoladas de cão em áreas onde a leishmaniose visceral e cutânea ocorrem, observou um padrão similar às cepas de *L. donovani* de pacientes humanos da mesma área.

O controle da leishmaniose visceral é realizado através de três procedimentos básicos, propostos desde 1961 por ALENCAR, que são: controle do vetor, sacrifício dos cães infectados e o tratamento dos casos humanos.

Para o tratamento das leishmanioses, no homem, os antimoniais pentavalentes, stibogluconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®), são as drogas de escolha devido a sua baixa toxicidade. Entretanto, quando são usadas na leishmaniose visceral canina apresentam-se parcialmente efetivas, normalmente há a presença de parasitas em animais clinicamente curados ou um retorno à doença (NEOGY, 1994).

Como o tratamento nestes animais normalmente não promovem uma cura satisfatória, uma das alternativas para o controle da doença é o seu sacrifício. Ao tomar-se esta medida poder-se-á deparar com dois problemas: o valor zootécnico e o valor afetivo do animal. Muitas vezes, os proprietários negam-se em sacrificar um cão que, em muitos casos, está aparentemente sadio, gerando, assim, um conflito com os agentes de saúde e conseqüentemente com o controle da doença, muitas vezes disseminando o parasito.

Por outro lado, a ansiedade dos clínicos de pequenos animais em tratar os cães acometidos tem gerado uma diversidade de protocolos de tratamento que pode acarretar na seleção de parasitas resistentes aos antimoniais.

Deste modo, necessita-se que novas drogas ou novos ensaios terapêuticos com drogas antigas sejam testados para que possam ser utilizados em larga escala contribuindo indiretamente para o controle da doença.

Objetivo deste trabalho foi testar diferentes esquemas terapêuticos em cães assintomáticos infectados experimentalmente com *L. chagasi* utilizando o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) associado ou não à uma vacina contra leishmaniose visceral canina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A taxonomia da *Leishmania* foi por muitos anos baseada no aspecto clínico exibido pelo paciente, na morfologia do parasito, desenvolvimento em meio de cultura e nos vetores, distribuição geográfica e pela infecção experimental em animais de laboratório. Nas duas últimas décadas, métodos bioquímicos e imunológicos, tais como, padrões de isoenzimas, mapeamento de DNA, reatividade imunológica a anticorpos monoclonais e análise de ácido graxo, tem sido utilizados para este fim, melhorando substancialmente a caracterização de cepas isoladas (KONTOS & KOUTINAS, 1993).

A leishmaniose visceral canina apresenta um amplo espectro de formas clínicas. Em estudos experimentais foi classificada por LANOTTE et al (1979) quanto a evolução clínica em formas aguda, subaguda, crônica e regressiva espontânea e por GENARO (1993) em forma frusta, regressiva espontânea, aguda e crônica.

Os sinais clínicos mais comuns desenvolvidos pelos animais são caquexia, períodos de febre irregulares, mucosas com coloração pálida, perda de peso progressiva, hepato-esplenomegalia, perda de pelo generalizada, descamação e eczema, úlceras simples ou confluentes na orelha e focinho e onicogribose (LONGSTAFFE et al, 1983; KEENAN et al, 1984; MARZOCHI et al, 1985).

O exame hematológico mostra, no cão, uma anemia normocítica normocrômica (GENARO, 1993; KEENAN et al, 1984), aumento do número de linfócitos e uma diminuição dos polimorfonucleares (GIAUFFRET, 1976). Por outro lado, leucocitose, leucopenia, linfopenia e neutrofilia são citados por outros autores (SLAPPENDEL, 1988; TRYPHONAS et al, 1977).

Normalmente não são observados valores elevados nas provas utilizadas para avaliar função renal e hepática, tais como, uréia, creatinina, bilirubina, aspartato aminotransferase, alanino

aminotransferase e fosfatase alcalina (GENARO, 1993; GARETT, 1978; KEENAN et al, 1984a). Uremia associada com hipercreatinemia, alanino aminotransferase e fosfatase alcalina sérica aumentadas são encontradas em cães sintomáticos com quadro clínico avançado (SLAPPENDEL, 1988).

O perfil eletroforético é caracterizado por disproteinemia com aumento das proteínas totais, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. As frações  $\beta$  e  $\gamma$  globulinas estão marcadamente elevadas (GIAUFFRET et al, 1976; CECI & PETAZZI, 1983; KEENAN et al, 1984a; SLAPPENDEL, 1988, ROMDANE et al, 1992; GENARO, 1993).

Os testes sorológicos mais utilizados no diagnóstico do calazar são a reação de imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático e a aglutinação direta (HAILU, 1990; EVANS et al, 1990; RACHAMIM et al, 1991), porém ocorrem reações cruzadas com leishmaniose cutânea, micobactérias e com outros tripanossomatídeos.

Atualmente, encontra-se em fase de validação um teste de imunocromatografia (TRALd - Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani*) considerado altamente sensível e específico para diagnóstico da leishmaniose visceral humana o qual usa um antígeno recombinante (K39) de amastigota de *L. chagasi*. BADARÓ et al (1996) ao realizarem FAST-ELISA para detectar anticorpos específicos anti- *Leishmania* utilizando o rK39 como antígeno, observaram que soro de pacientes e cães com leishmaniose visceral aguda apresentaram altos títulos de anticorpos anti rK39, mas pacientes assintomáticos ou com cura espontânea tinham baixos ou níveis não detectáveis de anticorpos contra o mesmo antígeno. Por outro lado, em pacientes com infecção subclínica que posteriormente progrediram para a forma aguda, anticorpos anti-rK39 foram detectados poucos meses antes da doença tornar-se evidente.

Sensibilidade de 92,16% e especificidade de 99,52% para o TRALd foi obtida por FRANÇA-SILVA (1997) em uma amostra de 1798 cães utilizando como padrão ouro a reação de imunofluorescência indireta, técnica de referência adotada pela Fundação Nacional de Saúde em inquéritos epidemiológicos.

Em geral, a resposta proliferativa de linfócitos frente à antígenos de *Leishmania* é observada na leishmaniose cutânea e cutâneo-mucosa, estando ausente na leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose visceral (GRIMALDI JR & TESH, 1993).



Neste âmbito, este tipo de resposta é observada fracamente em cães (ABRANCHES et al, 1991; MARTINEZ-MORENO et al, 1993; GENARO, 1993) e humanos (CARVALHO et al, 1985; CARVALHO et al, 1988) com leishmaniose visceral ativa.

Foi observado que cães assintomáticos infectados com *L. infantum* responderam positivamente aos testes de proliferação de linfócitos e reação de hipersensibilidade retardada, em contraste ao que foi observado em cães sintomáticos (PINELLI et al, 1994).

Animais inoculados experimentalmente com promastigotas de *L. chagasi* por via endovenosa ou intradérmica, responderam ao teste intradérmico de Montenegro seis meses após o inóculo. Após prolongado período da doença, 68,8 % aumentaram o diâmetro médio da induração, 28,1 % diminuíram e 3,1 % mantiveram a intensidade da reação (GENARO, 1993). A estimulação da resposta proliferativa específica foi observada em um cão com a forma regressiva espontânea da doença.

GENARO et al (1993) observaram resposta linfoproliferativa negativa em cães sintomáticos e em 6 de 10 cães assintomáticos, sugerindo uma correlação inversa entre a resposta e a severidade da doença.

Em cães vacinados contra leishmaniose visceral com promastigotas de *L. (V). braziliensis* (MCAN/BR/72/C348) observou-se resposta proliferativa de linfócitos e intradermorreação positivas nos animais protegidos após desafio com promastigotas da cepa MHOM/BR/72/BH46 de *L. (L). chagasi* (MAYRINK et al, 1994). A resposta proliferativa de linfócitos e a produção de citocinas está associado com a recuperação de doença ativa em humanos (CARVALHO et al, 1985).

Os achados anatomo-patológicos da leishmaniose visceral canina são semelhantes aos encontrados no homem. As lesões são decorrentes da resposta imune do hospedeiro, alterações celulares e por deposição de IgG, IgM e C<sub>3</sub> no interstício (MANCIANTI et al, 1989).

Em órgãos não linfóides observa-se um infiltrado inflamatório composto quase exclusivamente por macrófagos parasitados, células plasmáticas e linfócitos. Este pode ser encontrado na derme, fígado, intestino, rins, pulmão, coração, cérebro, olho e sinóvia causando graus variados de destruição tissular (LONGSTAFFE & GUY, 1985).

Em cães naturalmente infectados com *Leishmania donovani* foram observadas alterações nos glomérulos renais que vão desde um espessamento difuso do mesângio, sem hiper celularidade, até uma glomerulonefrite proliferativa progressiva, com duas formas, focal e segmentar, e a difusa (AYALA, 1973; MANCIANTI et al, 1989).

Analisando rins de cães, natural e experimentalmente infectados, TAFURI et al (1989) observaram proliferação mesangial focal ou difusa com intenso espessamento da matriz; espessamento irregular da membrana basal; infiltrado intertubular na cortical e medular de células plasmáticas; aderência entre os folhetos parietal e visceral da cápsula de bowman.

As lesões renais estão associadas com uma severa proteinúria e pode levar a uma falha renal crônica e/ou a uma síndrome nefrótica (KONTOS & KOUTINAS, 1993).

Lesões hepáticas tais como hepatite com infiltrado de células mononucleares e neutrófilos; agregados de macrófagos distribuídos no parênquima e periportal, hiperplasia de células de Kúpffer foram descritas por GENARO (1993), KENNAN et al (1984b) e OLIVEIRA et al (1993).

No baço podem ser encontradas alterações como hiperplasia de folículo linfóide, congestão de polpa vermelha e parasitismo de macrófagos (KENNAN et al, 1984b; GENARO, 1993; LONGSTAFFE et al, 1983).

TAFURI et al (1993) utilizando o Leishvacin® no teste intradérmico para diagnóstico de leishmaniose tegumentar observaram reação inflamatória disposta em torno dos vasos, anexos e nervos, com células mononucleares na derme superficial, profunda e hipoderme; às vezes presença de células plasmáticas, neutrófilos e raros eosinófilos; edema e zona de necrose com destruição das fibras do colágeno; congestão, edema e ectasia de vasos linfáticos.

GENARO (1993) utilizando-se deste mesmo antígeno para o teste intradérmico de Montenegro na leishmaniose visceral canina, encontrou um quadro histológico típico constituído de um infiltrado inflamatório grânulo-histio-linfocitário perianexial e perivascular na derme e às vezes na hipoderme.

Há 40 anos, os antimoniais pentavalentes, stibogluconato de sódio e antimoniato de N-metil glucamina, são as drogas de eleição no

tratamento do calazar humano (OLLIARO & BRYCESON, 1993). A OMS (Organização Mundial de Saúde) recomenda que os pacientes sejam tratados durante trinta dias com 20 mg Sb<sup>v</sup>/Kg/dia. Anteriormente, recomendava-se uma dose máxima de 850 mg Sb<sup>v</sup>/Kg/dia. Entretanto, mais recentemente, o esquema terapêutico foi avaliado e não há mais limite máximo na dose diária de 20 mg Sb/Kg (MANUAL..., 1997).

Em uma comunidade tribal na Índia, foi administrado 20 mg/Kg de stibogluconato de sódio durante 20 dias em casos novos e durante 40 dias, com dosagem máxima de 850 mg, em pacientes com recidiva. Os pacientes que não responderam ao tratamento de 20 dias de duração foram classificados como resistência primária (THAKUR, 1994).

O mecanismo de ação não é totalmente conhecido, provavelmente estes compostos destroem o parasita bloqueando a formação de GTP e ATP, inibindo duas enzimas dentro do metabolismo do parasito: a fosfofrutoquinase e a piruvato desidrogenase (AMUSATEGUI et al, 1995).

Sabe-se muito pouco sobre o mecanismo de ação dos antimoniais no cão. TASSI et al (1994) ao estudarem a farmacocinética do antimoniato de N-metil glucamina pelas vias intravenosa, intramuscular e subcutânea sugeriram que a administração subcutânea seria a mais indicada pois permite uma persistência maior do antimônio no sangue.

BELLOLI et al (1995) observaram que a concentração sérica do antimoniato de N-metil glucamina era mantida em níveis considerados eficientes após 12 horas quando a droga foi administrada em associação com a aminosidina por via subcutânea.

A resistência do parasito a estas drogas tem aumentado em muitos países (DAVIDSON & CROFT, 1993). GRAMICCIA et al (1992) demonstraram um decréscimo na sensibilidade ao antimoniato de N-metil glucamina de *L. infantum* isolada de cães naturalmente infectados após vários cursos de tratamento. Após a terapia, os animais permaneceram infectantes para *Phlebotomus perniciosus*.

No tratamento de cães, alguns trabalhos utilizando antimoniais pentavalentes e pentamidinas podem ser encontrados (REITER et al, 1985; GARET, 1978; MARZOCHI et al, 1985; TRYPHONAS et al, 1977; GIAUFFRET et al, 1976), entretanto nenhum deles determinou a cura parasitológica.

MANCIANTI et al (1988) ao tratarem cães naturalmente infectados com *L. infantum* com antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) na dose de 100 mg/kg/dia em três ciclos de 10 dias seguido do mesmo período de intervalo, conseguiram recuperação de sinais clínicos e sorologia negativa de 47,2% em animais assintomáticos, 33,3% em oligossintomáticos e 11,1% em sintomáticos, além da prevenção de doença patente em 90% dos assintomáticos não recuperados.

Cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* e tratados com Glucantime® na dose de 60 mg/kg/dia associado com 600 µg de proteína de *L. (V.) braziliensis* (MCAN/BR/72/C348) mais 500 µg de BCG em duas doses com três meses de intervalo (MAYRINK et al, 1992) apresentaram, após um ano de observação, decréscimo mas não negatização dos níveis de anticorpos, parasitológico de pele e medula negativos, normalização da gamaglobulinemia, desaparecimento dos sintomas e ganho de peso.

RIERA et al (1996) ao tratar cães experimentalmente infectados com antimoniato de N-metil glucamina na dose de 75 mg/Kg a cada 12 horas por dois períodos de dez dias observou queda no título de anticorpo pelo Dot-ELISA e ELISA e queda da intensidade das bandas no Western blot, porém, o parasita foi novamente detectado no linfonodo seis semanas pós-tratamento. Em humanos, níveis altos de IgG foram observados até 8 meses após o término do tratamento com stibogluconato de sódio (NEOGY et al, 1986).

Cura parasitológica de 100% foi observada em cães sintomáticos tratados com 20 aplicações intramuscular de 300 mg/kg de Glucantime® em dias alternados associado a uma vacina constituída de uma fração antigênica purificada de promastigotas de *L. infantum*. A vacina foi administrada 15 dias após o término da quimioterapia sendo realizada em três doses com intervalo de sete dias. Por outro lado, os grupos tratados com Glucantime® ou imunoterapia isoladamente apresentaram cura parasitológica de 37,5% e 25%, respectivamente (NEOGY et al, 1994).

Proteção de 90% foi obtida em dez cães vacinados com três doses de uma vacina constituída de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* cepa MCAN/BR/72/C348 (600 µg/dose) associada ao BCG (400 µg/dose) como adjuvante e desafiados com promastigotas da cepa MHOM/BR/72/BH46 de *L. (L.) chagasi* (MAYRINK et al, 1994). A vacina

foi capaz de induzir resposta imune celular a qual foi acompanhada através do teste de proliferação de linfócitos e do teste de Montenegro.

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. LOCAL DE EXECUÇÃO

O trabalho experimental foi desenvolvido no Laboratório de Leishmaniose do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e no Laboratório de Pós-Graduação do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

#### 3.2. ANIMAIS

##### 3.2.1. CÃES

Foram utilizados 32 cães sem raça definida, sendo 15 machos e 17 fêmeas, com idade variando entre 8 e 14 meses, nascidos e criados no canil de testes de vacinas contra leishmaniose do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) no qual permaneceram durante todo o experimento. Todos os animais foram vermifugados com um anti-helmíntico de largo espectro<sup>1</sup> e vacinados com uma polivacina<sup>2</sup> contra cinomose, parvovirose, adenovirose, parainfluenza e leptospirose, de acordo com o esquema de imunização proposto pelo fabricante. Os cães foram alimentados com ração comercial balanceada<sup>3</sup> e água potável fornecida *ad libitum*.

---

<sup>1</sup> Drontal-plus® – Bayer

<sup>2</sup> Masterguard-plus® – Solvay

<sup>3</sup> Kinus® – Brasvel

### 3.2.2. HAMSTERS

Foram utilizados hamsters *Mesocricetus auratus* para manutenção das cepas de *Leishmania* e para avaliação da viabilidade das formas amastigotas inoculadas nos cães. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

### 3.2.3. COELHOS

Coelhos da raça Nova Zelândia foram utilizados para obtenção de sangue para produção de meio de cultura. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

### 3.3. MEIOS DE CULTURA

Os meios utilizados foram os de NNN (segundo NICOLLE, NOVY & NEAL, 1908) e o LIT (Liver Infusion Tryptose, segundo CAMARGO, 1964). Ambos foram associados para preparação do meio difásico NNN/LIT (segundo COSTA et al, 1983).

### 3.4. CEPA DE *Leishmania* USADA NA INFECÇÃO DOS CÃES

A cepa utilizada foi a MHOM/BR/72/BH46 de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* isolada por Mayrink (1972) de um caso humano de leishmaniose visceral, oriundo do município de Mantena, MG. A manutenção da cepa foi feita através de passagens seriadas em hamsters.

#### 3.4.1. INÓCULO

Para obtenção dos inóculos, os hamsters eram sedados com éter em um recipiente de vidro com tampa, imobilizados em um suporte de "isopor" e, após antissepsia da região abdominal, a cavidade foi aberta e o baço coletado de forma asséptica.

Os baços de quatro animais foram transferidos para um triturador de tecidos e triturado em salina. Depois de diluída a 1/20, as formas amastigotas foram contadas em câmara de Neubauer e padronizada para  $1,0 \times 10^7$  formas amastigotas por mililitro de solução. Os cães foram inoculados com um mL da suspensão por via endovenosa.

Com o objetivo de avaliar a viabilidade do inóculo, a solução padronizada foi reinoculada por via intraperitoneal em quatro hamsters, os quais foram sacrificados ao apresentarem sintomatologia clínica da doença. O baço foi coletado para realização de esfregaços em lâminas. Estas foram coradas com Giemsa e observadas em objetiva de imersão para visualização dos parasitas.

### 3.4.2. ANTÍGENO PARA A AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL

A cepa utilizada como fonte para a produção de antígenos foi a MHOM/BR/60/BH6 de *Leishmania (Leishmania) mexicana*, isolada de um caso humano de leishmaniose tegumentar. Posteriormente, foi reisolada de hamster em 1973 para o meio de cultura NNN e a seguir, transferida para o meio de cultura LIT.

#### Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

Foram utilizadas formas promastigotas de *L. mexicana* (cepa BH6) mantidas em crescimento logarítmico no meio de LIT. Após 48 horas de cultivo, os parasitos foram fixados em formalina a 5% por trinta minutos e, posteriormente, centrifugados a  $520 \times g$  por dez minutos. O sedimento foi lavado quatro vezes em solução salina fisiológica tamponada com fosfatos, pH 7.2. Finalmente, o sedimento foi resuspenso em solução salina fisiológica tamponada de tal forma que uma gota da suspensão colocada em lâmina, sob lamínula (24 x 24mm), contivesse cerca de dez a vinte promastigotas por campo ao exame microscópico com objetiva de 40X. Após a padronização, 10  $\mu$ L da suspensão foram distribuídos em lâminas contendo 20 poços, as quais foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### Reação imunoenzimática (ELISA)

Foram utilizadas formas promastigotas de *L. mexicana* (cepa BH6) cultivadas por sete dias no meio LIT. Os parasitas foram lavados três



vezes por centrifugação a  $1400 \times g$  em solução salina fisiológica. Posteriormente, foram submetidos ao ultrassom 40W, 3 vezes durante 1 minuto com intervalo de um minuto em banho de gelo. Em seguida, o material sonicado foi centrifugado a  $15000 \times g$  durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e os níveis de proteína foram determinados pelo método de Lowry e padronizado para conter  $1000 \mu\text{g/mL}$ . O antígeno foi alíquotado e armazenado à  $-70^\circ\text{C}$ .

### 3.4.3. ANTÍGENOS PARA A AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR

#### Resposta Proliferativa de Linfócitos

Foram utilizadas formas promastigotas de *L. braziliensis* MCAN/BR/72/C348 isolada em 1972 de um cão residente na área de Caratinga/MG ( $19^\circ37'30''$  de latitude S e  $42^\circ09'00''$  de longitude W GRE, 575 m de altura). A cultura era mantida por sete dias no meio LIT. Os parasitas foram lavados três vezes por centrifugação a  $1400 \times g$  em solução salina fisiológica. Posteriormente, foram submetidos ao ultrassom 40W, 3 vezes durante 1 minuto com intervalo de um minuto em banho de gelo. Em seguida, o material sonicado foi centrifugado a  $15000 \times g$  durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e os níveis de proteína foram determinados pelo método de Lowry e padronizado para conter  $1000 \mu\text{g/mL}$ . O antígeno foi alíquotado e armazenado à  $-70^\circ\text{C}$ .

#### Teste intradérmico (Teste de Montenegro Modificado)

O antígeno utilizado foi uma vacina descrita por MAYRINK et al (1979) contra a leishmaniose tegumentar humana e testado para o teste em cães com sucesso. Tratava-se de um extrato de promastigotas, metade íntegra e metade sonicada, mertiolatada (1:10.000), constituída por cinco cepas de *Leishmania* :

1. MHOM/BR/60/BH6 - *Leishmania (L.) mexicana*
2. MHOM/BR/71/BH49 - *Leishmania ? sp*
3. MHOM/BR/73/BH121 - *Leishmania sp* (Complexo mexicana)
4. MHOM/BR/70/M1176 - *Leishmania (V.) guyanensis*
5. IFLA/BR/67/PH8 - *Leishmania (L.) amazonensis*

### 3.5. AGENTES TERAPÊUTICOS

#### 3.5.1. AGENTE IMUNOTERÁPICO

Foi utilizada uma vacina anti- leishmaniose visceral canina descrita por MAYRINK et al (1994) constituída de promastigotas da cepa MCAN/BR/72/C348 de *L. braziliensis*. O parasito foi cultivado durante 7 dias em meio LIT (Liver Infusion Tryptose segundo CAMARGO, 1964), lavado três vezes em PBS pH 7.2 e sonicado a 40W por três ciclos de 1 minuto. Tratava-se de uma suspensão mertiolatada a 1:10.000.

#### 3.5.2. AGENTE QUIMIOTERÁPICO

Foi utilizado o antimoniato de N-metil glucamina<sup>4</sup> na dose de 100 mg/Kg, durante 20 dias, por via subcutânea.

### 3.6. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

Para avaliar a resposta dos animais à infecção foram utilizados os seguintes parâmetros: exame parasitológico de medula e pele, detecção de anticorpos específicos (RIFI, ELISA e TRALd), imunidade celular (ensaio de proliferação de linfócitos e intradermoreação), hematologia, bioquímica sérica (proteína total, creatinina, bilirubina, alanino aminotransferase e aspartato aminotransferase) e histopatologia.

#### 3.6.1. PARASITOLÓGICO

Os parasitos foram detectados na medula óssea por realização de esfregaço em lâmina e cultura em meio difásico NNN/LIT ( COSTA et al, 1983), e por exame direto por aposição em lâmina da pele da região abdominal com intervalo de 40 dias. Para coleta da medula, foi realizada

---

<sup>4</sup> Glucantime® – Rhodia

tricotomia com posterior antissepsia da articulação fêmuro-tíbio-patelar e a tíbia puncionada na fossa intercondilar.

As leituras das culturas foram realizadas e repetidas três vezes com intervalo de quinze dias.

As lâminas foram coradas com Giemsa e a leitura realizada em microscópio óptico com objetiva de imersão.

Com 450 dias pós infecção, os cães foram sacrificados e o parasito pesquisado em esfregaço por aposição e/ou histopatologia de medula, linfonodos poplíteo e mesentérico, baço, fígado, ponta de nariz, ponta de orelha e cultura de baço utilizando o mesmo meio difásico.

### **3.6.2. IMUNOLÓGICOS**

#### **RESPOSTA IMUNE HUMORAL**

##### **Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

Cinco (5)  $\mu\text{L}$  de plasma foram diluídos em solução salina tamponada (PBS), pH 7.2 em diluições seriadas de 1/40 até 1/20.480. Dez (10)  $\mu\text{L}$  das diluições foram distribuídos em lâminas preparadas como descritas anteriormente. Após incubação de 30 minutos em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$ , as lâminas foram cobertas com PBS pH 7.2 e mantidas em repouso por cinco minutos. Posteriormente foram lavadas com água destilada e mantidas à temperatura ambiente até secarem.

Em cada poço foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de conjugado anti-Ig G de cão<sup>5</sup>, diluído 1:100. Novamente, o material foi levado para estufa, lavado e secado como descrito anteriormente. Após secagem, a lâmina foi montada com glicerina tamponada e lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência em objetiva de 40 x.

##### **Reação imunoenzimática (ELISA)**

---

<sup>5</sup> Biomanguinhos - Rio de Janeiro

Microplacas de poliestireno<sup>6</sup> com 96 poços foram sensibilizadas por 18 horas, durante a noite, a 4°C com o antígeno aqui descrito (3.4.2), diluído em tampão carbonato. Cada poço continha 2 µg de antígeno. Depois de sensibilizada, a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem. Após secagem em papel toalha, o bloqueio foi realizado com PBS-Caseína 2 %, 150 µL/poço, e a placa incubada em câmara úmida durante 1 hora a 37°C. Após nova série de quatro lavagens e secagem da placa, 100 µL de plasma diluído 1/80 em PBS-CASEÍNA foi distribuído e incubado durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Nova lavagem e secagem foram realizadas e 100 µL de conjugado anti- Ig G de cão<sup>7</sup> diluído 1:2000 em PBS-Caseína foi distribuído para mais uma incubação durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida. A placa foi lavada quatro vezes e secada para adição de 100 µL de substrato, o qual foi constituído de tampão citrato, peróxido de hidrogênio e o-fenilenodiamino (OPD<sup>8</sup>). Após repouso de 10 minutos, sob proteção da luz em temperatura ambiente, a reação foi paralisada com 25 µL/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N). A leitura foi feita em absorbância em leitor de ELISA<sup>9</sup> com filtro para comprimento de onda de 492 nanômetros (nm). O "cut off" utilizado foi de 0,158.

#### **Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* (TRALd)**

O TRALd é um ensaio imunocromatográfico no qual em uma extremidade da fita encontra-se o antígeno recombinante K39 como teste e uma anti-proteína A de caprino como controle. Durante o ensaio, o plasma, soro ou sangue é adicionado na extremidade oposta o qual reage com o conjugado proteína A-ouro coloidal. Após adição de um tampão, a mistura migra por capilaridade. Se a amostra contém anticorpos contra o antígeno, uma banda na região teste surgirá entre cinco a dez minutos. Como controle de migração, uma banda sempre aparecerá na região controle

---

<sup>6</sup> Sigma Chemical Co.

<sup>7</sup> Sigma Chemical Co.

<sup>8</sup> Sigma Chemical Co.

<sup>9</sup> Multiskan® MCC 340

Figura 1. Esquema da fita imunocromatográfica do TRALd

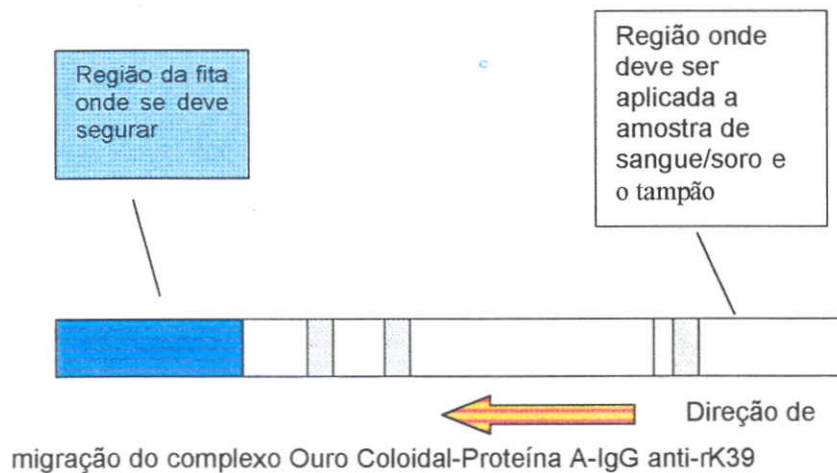


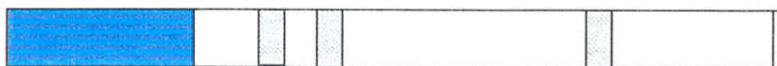
Figura 1A. Teste positivo. Além da linha que aparece na região controle (em vermelho), uma linha distinta aparece na região teste (em vermelho).



Figura 1B. Teste negativo. Uma linha aparece na região controle (em vermelho) e nenhuma outra linha aparece na região teste (em cinza).



Figura 1C. Teste indeterminado. Nenhuma linha aparece, inclusive na região controle (em cinza). Neste caso, o procedimento do teste, pode ter sido feito incorreto ou a fita apresentar defeitos.



## RESPOSTA IMUNE CELULAR

### Resposta Proliferativa de Linfócitos

Dez (10) mL de sangue dos cães foram coletados assepticamente em seringa com heparina. Oito a 10 mL do sangue heparinizado foi adicionado a 4 mL de ficoll-hypaque<sup>10</sup>, submetido a centrifugação a 140 x g, a 20° C por 1 hora. O anel de mononucleares foi colhido utilizando-se pipeta de pasteur e desprezado em tubo falcon contendo 5 mL de RPMI 1640<sup>11</sup>. As células foram lavadas 2 vezes com o mesmo volume de meio a 34 x g, a 4°C durante 15 minutos. Após a contagem das células em câmara de Neubauer com auxílio de corante vital azul de trypan, estas foram ajustadas para uma concentração final de  $5,2 \times 10^6$  células mononucleares por mL de RPMI 1640 completo com 10% de soro fetal

<sup>10</sup> Ficoll 400-DL – Sigma Chemical Co.

<sup>11</sup> Sigma Chemical Co.

bovino inativado e plaqueadas em microplacas<sup>12</sup> com fundo chato no volume de 200  $\mu$ L da suspensão/poço. A cultura foi feita em triplicata em poços contendo 10  $\mu$ L do antígeno, aqui descrito (3.4.3), na concentração de 50  $\mu$ g/mL ou 10  $\mu$ L de fitohemaglutinina (PHA) na concentração de 200  $\mu$ g/mL. Após 48 horas, para fitohemaglutinina e 120 horas para o antígeno 348, foi adicionado 0.2  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]-timidina<sup>13</sup>/25  $\mu$ L de RPMI 1640. As células foram coletadas com lavador de células tipo harverst<sup>14</sup> em papel filtro<sup>15</sup> e a incorporação da radioatividade medida pelo uso de um contador de cintilação líquida<sup>16</sup>. Os resultados foram expressos em índice de estimulação (IE) calculados pela média das contagens dos poços com mitógeno ou antígeno, dividida pela média dos poços controles (aqueles no qual o cultivo celular se deu na ausência de mitógeno ou antígeno). Foi considerada como resposta positiva um índice de estimulação maior ou igual a 2,5.

#### **Intradermorreação (Teste de Montenegro Modificado)**

Foi realizada tricotomia da região medial da coxa esquerda e inoculado por via intradérmica 0,1 mL do antígeno aqui descrito (3.4.3). A leitura foi realizada após 72 horas, de acordo com GENARO et al (1988).

#### **3.6.3. HEMATOLÓGICOS**

Os animais foram submetidos a exames de sangue (eritrograma leucogramas), mensalmente, durante todo período experimental. Cada animal foram coletados cinco mililitros de sangue e adicionadas duas gotas de EDTA a 10%.

A interpretação dos dados hematológicos foi feita de acordo com JAIN (1993) e KIRK (1984).

---

<sup>12</sup> Nunclon®

<sup>13</sup> Sigma Chemical Co.

<sup>14</sup> Cell Harvester Flow Laboratories – Titertek®

<sup>15</sup> Glass microfibre filters – Whatman®

<sup>16</sup> Rack beta 1209 LKB Wallac

#### 3.6.4. BIOQUÍMICO

Foram realizadas dosagens séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), creatinina usando espectrofotômetro e de bilirubina com reflotrom. Estas análises foram realizadas antes da inoculação do parasito e durante o tratamento.

Dosagens de proteína total, albumina e das frações alfa 1, alfa 2, beta e gama globulinas, através da eletroforese do plasma sanguíneo em acetato celulose foram realizadas mensalmente.

A migração eletroforética foi realizada sob corrente de 200 volts durante 20 minutos. As fitas foram coradas com corante Ponceau durante cinco minutos e posteriormente transparentizadas por três minutos. A secagem foi realizada em estufa a 60° C durante cinco minutos.

A leitura das fitas foi realizada em densitômetro<sup>17</sup> pelo programa CS - 9301PC.

#### 3.6.5. HISTOPATOLÓGICO

Após o término do experimento, os animais foram sacrificados e fragmentos do baço, fígado, linfonodos poplíteo e mesentérico, rins, intestino delgado, ponta de orelha e ponta de nariz foram fixados em formol tamponado a 10% e corados pela hematoxilina-eosina para análise sob o ponto de vista histopatológico.

Biópsia do local do teste intradérmico também foram feitas, fixadas e processadas da mesma forma.

Quando necessário, fragmentos de rim e pulmão foram corados pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e pelo grocott metanamina nitrato de prata.

#### 3.7. ESQUEMA TERAPÊUTICO

Confirmada a infecção, por sorologia e/ou parasitológico, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de oito animais que

---

<sup>17</sup> Shimadzu Dual Wavelength Flying Spot Scanning Densitometer



receberam os seguintes esquemas terapêuticos em três séries de administração:

**GRUPO A.** Imunoterapia, utilizando a vacina contra leishmaniose visceral canina, na dose de 0.25 mL durante 20 dias por via subcutânea com o intervalo de 10 dias para nova aplicação.

Cada 0,25 mL de vacina continha 500 $\mu$ g de proteína de *Leishmania*.

**GRUPO B.** Quimioterapia, utilizando o antimoniato de N-metil glucamina na dose de 100mg/Kg por via subcutânea durante 20 dias com o intervalo de 10 dias para nova aplicação.

**GRUPO C.** Imunoquimioterapia, utilizando a associação da vacina contra leishmaniose visceral canina e o antimoniato de N- metil glucamina nas mesmas doses usadas para os grupos A e B com intervalo de 10 dias para realização de uma nova série.

**GRUPO D.** Controle não tratado.

O antimônio e a vacina foram administrados subcutaneamente no hemitórax direito e esquerdo, respectivamente.

### 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos são referentes ao período de 450 dias pós infecção (p.i). Para análise estatística, foram selecionados os dados correspondentes ao período pré-inoculação (0), tratamento (150, 180, 210 e 240 dias p.i), 30 dias após o término do tratamento (270 dias p.i) e 420 e 450 dias p.i.

A análise de variância e o teste t de student foram realizados pelo procedimento GLM do SAS...(1995).

Os dados não paramétricos foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. EVOLUÇÃO CLÍNICA

Durante o experimento, quatro cães (12,5%), sendo três do grupo B e um do grupo A, apresentaram sinais clínicos como emagrecimento, onicogribose, alopecia simétrica bilateral com descamação seca no dorso, alopecia periorbital, lesões nas articulações do tarso, carpo, coxo-femural e fêmuro-tíbio-patelar que variaram de uma dermatite crostosa a presença de úlceras. Dois destes animais, apresentaram infestação por *Demodex canis* visualizado pelo raspado de pele. Este parasito é encontrado em pequeno número na pele de cães saudáveis, sendo que o processo inflamatório produzido por ele está associado a uma supressão de células T (SCOTT, 1979). Contudo, a ocorrência de sama demodécica associada a leishmaniose visceral canina tem sido descrita (KENNAN et al, 1984b). Provavelmente, isto deve-se a imunossupressão favorecida pela infecção por *Leishmania*.

### 4.2. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

#### 4.2.1. PARASITOLÓGICO

No exame parasitológico, treze animais apresentaram-se positivos, sendo quatro do grupo A, um do grupo B, três do grupo C e cinco do grupo D (Tab.1).

Após a terceira série do tratamento, observou-se ausência de parasitos na medula óssea nos grupos B e C contrastando com os grupos A e D (Tab. 2). No fim do experimento, o parasito foi encontrado em esfregaço por aposição de linfonodo poplíteo no grupo B e em medula e histopatologia dos linfonodos poplíteo e mesentérico e ponta de nariz no

grupo C. Dois cães do grupo C que não apresentaram parasitos pelas demais técnicas foram detectados pela histopatologia (Tab.4). Nesta, a visualização do parasita é dificultada pela superposição das camadas de células, o que demanda um período maior de tempo na observação da lâmina à procura do mesmo, caso o órgão não esteja intensamente parasitado.

Sumarizando, após 450 dias pós-infecção (210 dias pós-tratamento), foram encontrados parasitos em 40% dos cães do grupo A, 12,5% dos cães do grupo B, 21% dos cães do grupo C e 62,5% do grupo D.

A baixa frequência do parasita nos grupos B e C pode estar relacionada com dois fatores: a) os animais eram assintomáticos e b) a capacidade do antimônio em reduzir o número de parasitas no cão. A segunda afirmativa seria a mais coerente já que, mesmo também estando assintomáticos, observa-se um maior número de cães parasitados nos grupos A e D.

## 4.2.2. IMUNOLÓGICOS

### 4.2.2.1. RESPOSTA IMUNE HUMORAL

A RIFI foi o teste tomado como referência para determinar o início da infecção e tratamento por três motivos: a) os animais foram criados em canis de experimentação com controle de vetores evitando uma infecção natural de leishmaniose visceral ou qualquer outra enfermidade que permitisse uma reação cruzada, desta forma, a soroconversão observada foi considerada como resultado da infecção experimental; b) os animais poderiam levar meses para apresentarem-se positivos no exame parasitológico de medula; c) a boa performance do teste em detectar anticorpos anti-*Leishmania*.

Através da RIFI, foi observado positividade 60 dias p.i, com título 1/40, em cinco animais. Com 90 dias p.i, todos os cães apresentaram sorologia positiva variando de 1/320 a 1/5120. Como observado na Fig. 1, após terceira série do tratamento, houve diminuição no título de anticorpos nos grupos B e C. Foi observada diferença estatística ( $p < 0.05$ ) 450 dias p.i entre os grupos A/C, B/D e C/D. Apesar da queda ~~no título~~, não houve negatização do teste até 210 dias após o término do

grupo C. Dois cães do grupo C que não apresentaram parasitos pelas demais técnicas foram detectados pela histopatologia (Tab.4). Nesta, a visualização do parasita é dificultada pela superposição das camadas de células, o que demanda um período maior de tempo na observação da lâmina à procura do mesmo, caso o órgão não esteja intensamente parasitado.

Sumarizando, após 450 dias pós-infecção (210 dias pós-tratamento), foram encontrados parasitos em 40% dos cães do grupo A, 12,5% dos cães do grupo B, 21% dos cães do grupo C e 62,5% do grupo D.

A baixa frequência do parasita nos grupos B e C pode estar relacionada com dois fatores: a) os animais eram assintomáticos e b) a capacidade do antimônio em reduzir o número de parasitas no cão. A segunda afirmativa seria a mais coerente já que, mesmo também estando assintomáticos, observa-se um maior número de cães parasitados nos grupos A e D.

## 4.2.2. IMUNOLÓGICOS

### 4.2.2.1. RESPOSTA IMUNE HUMORAL

A RIFI foi o teste tomado como referência para determinar o início da infecção e tratamento por três motivos: a) os animais foram criados em canis de experimentação com controle de vetores evitando uma infecção natural de leishmaniose visceral ou qualquer outra enfermidade que permitisse uma reação cruzada, desta forma, a soroconversão observada foi considerada como resultado da infecção experimental; b) os animais poderiam levar meses para apresentarem-se positivos no exame parasitológico de medula; c) a boa performance do teste em detectar anticorpos anti-*Leishmania*.

Através da RIFI, foi observado positividade 60 dias p.i, com título 1/40, em cinco animais. Com 90 dias p.i, todos os cães apresentaram sorologia positiva variando de 1/320 a 1/5120. Como observado na Fig. 1, após terceira série do tratamento, houve diminuição no título de anticorpos nos grupos B e C. Foi observada diferença estatística ( $p < 0.05$ ) 450 dias p.i entre os grupos A/C, B/D e C/D. Apesar da queda do título, não houve negatificação do teste até 210 dias após o término do

tratamento. Em humanos, NEOGY et al (1986), observou níveis de IgG mais altos do que o normal depois de oito meses pós tratamento.

No mesmo período, no teste de ELISA (Fig. 2), houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos A/C e C/D. O grupo C apresentou níveis abaixo do "cut off".

O teste de imunocromatografia (TRALd) apresentou positividade similar ao da RIFI, com todos os animais sendo reativos 90 dias p.i. Da mesma forma, não houve negatização do teste nos quatro grupos após o tratamento, sugerindo a presença de anticorpos anti K39 e conseqüentemente a permanência da infecção nos animais (FIG. 3). Estes resultados sugerem que o TRALd possa vir a ser usado como critério de cura no tratamento da leishmaniose visceral canina.

#### 4.2.2.2. RESPOSTA IMUNE CELULAR

Resposta proliferativa de linfócitos acima de 2,5 foi observada apenas trinta dias após a inoculação dos cães nos grupos C e D (Fig. 4), permanecendo abaixo deste valor até o fim do experimento. Resposta proliferativa negativa foi observada em animais (ABRANCHES et al, 1991; MARTINEZ-MORENO et al, 1993; GENARO, 1993; ; GENARO et al, 1993) e humanos (CARVALHO et al, 1985; CARVALHO et al, 1988) com infecção ativa devido a imunossupressão antígeno específica induzida pela leishmaniose visceral. Neste trabalho, objetivou-se também analisar a resposta celular frente ao antígeno vacinal. Nos grupos onde foi administrada a vacina (grupos A e C), persistiu durante todo o experimento proliferação celular negativa, o que pode indicar a não eficiência da mesma em estimular imunidade celular em cães. Isto pode ter ocorrido devido a ausência de adjuvante para permitir uma amplificação da resposta imune já que resultado oposto foi conseguido por MAYRINK et al (1994) utilizando o mesmo antígeno adicionado de BCG.

A intradormorreação foi realizada apenas no dia do sacrifício dos cães com uma taxa de respondedores de 62,5% (5/8) no grupo A, 85,7% (6/7) no grupo B, 71,4% (5/7) no grupo C e 28,5% (2/7) no grupo D. Nos animais onde não foram encontrados parasitos nos tecidos pesquisados, o teste foi positivo; em cães parasitados, o teste foi negativo. Resultado inverso ocorreu em três animais do grupo A e um do grupo C (Tab. 1).

Reação de hipersensibilidade tardia positiva foi observada por PINELLI et al (1994) em cães assintomáticos, por MAYRINK et al (1994) em cães protegidos após vacinação e por GENARO (1993) em animais com até 56 meses pós infecção. Neste trabalho seria necessário um período maior de observação dos cães para que fosse tirada alguma conclusão já que não houve declínio da sorologia até 210 dias pós-tratamento o que poderia caracterizar a persistência de um baixo parasitismo.

#### 4.2.3. HEMATOLÓGICOS

A hematimetria (Fig. 5) e o volume globular mantiveram-se dentro do valor normal em todas as coletas, apenas a hemoglobinometria apresentou-se levemente abaixo do normal (11,3 g/dL; valor de referência: 12-18 g/dL) com 450 dias p.i no grupo D. Na leitura dos esfregaços, as hemácias apresentavam-se normocíticas/normocrômicas.

A contagem global de leucócitos, quando comparadas as médias entre grupos, manteve-se dentro do valor normal. Na comparação das médias entre coletas observa-se leucocitose 450 dias p.i. Neste mesmo período foi observada leucocitose (Fig. 6) com neutrofilia (13.546/ $\mu$ L) e leve linfocitose (5.249/ $\mu$ L) absoluta no grupo B e eosinofilia absoluta nos grupos A (1.638/ $\mu$ L), B (4.874/ $\mu$ L) e C (2.363/ $\mu$ L).

Estes resultados são contrários ao que normalmente é citado na literatura em animais com leishmaniose visceral, isto é, leucopenia com linfocitose e neutropenia. Achados como leucocitose, linfopenia e neutrofilia são relatados por outros autores (SLAPPENDEL, 1988; TRYPHONAS et al, 1977), indicando que a hematimetria e a leucometria devem ser utilizados para auxiliar no prognóstico e não como diagnóstico pois o seu resultado dependerá de fatores como estágio da infecção e associação com outras enfermidades tais como parasitoses ou infecções bacterianas secundárias.

Em animais que apresentem lesões de pele com infecções secundárias pode-se observar leucocitose com neutrofilia, porém não era o quadro clínico dos animais do grupo B. A eosinofilia é inconstante, porém pode mostrar valores elevados em períodos da invasão parasitária.

#### 4.2.4. BIOQUÍMICO

Os valores da aspartato aminotransferase (Fig. 7), alanino aminotransferase (Fig. 8) e creatinina (Fig. 9) mantiveram-se dentro da normalidade quando comparadas as médias entre grupos e coletas (valores de referência 13 - 93 U/L, 21 - 102 U/L e 0.5 - 1.5 mg/dL, respectivamente)

A bilirubina sérica manteve-se em níveis abaixo de 0,5 mg/ dL (valor de referência: 0.1 - 0.5 mg/dL).

Estes resultados estão de acordo com KEENAN et al (1984) e GENARO (1993). A realização destes testes objetivava também perceber alterações decorrentes da quimioterapia, já que a droga, após absorção, atinge concentrações elevadas no fígado e baço e é eliminada por via renal. A ausência de alteração na bioquímica sanguínea pode estar relacionada com a precocidade do tratamento. Como os animais estavam na fase inicial da infecção, provavelmente ainda não haviam lesões decorrentes da resposta imunológica contra o parasita, favorecendo uma boa tolerância à medicação.

Níveis acima do normal na proteína sérica total (valor de referência: 5.4 - 7.1 g/dL) foram observados 150 e 180 dias p.i (Fig. 10). Com 210 dias p.i., os valores foram normalizados nos quatro grupos, porém níveis mais baixos são encontrados nos grupos B e C.

Através da análise da eletroforese, as frações de albumina, alfa e beta globulinas mantiveram-se dentro dos valores normais na comparação entre grupos e coletas. Com relação a fração gamaglobulina, na comparação entre grupos estava aumentada nos grupos A e D e entre coletas, o aumento foi observado 150 e 180 dias p.i (valor de referência: 0,4 - 1,0 g/dL).

Observando-se as Figs. 11A, 11B, 11C e 11D verifica-se que nos quatro grupos a fração das gamaglobulinas estava acima do normal com 150 e 180 dias p.i.); nos grupos B e C os valores foram normalizados a partir da segunda série de tratamento; b) no mesmo período, houve inversão da relação albumina/globulina (A/G) apenas no grupo B. A inversão da relação A/G (valor de referência: 0,7 - 1,1) e a formação do bloco beta-gama foram observados em animais isoladamente dentro dos grupos A, B e D 450 dias p.i.

Diminuição da albumina, aumento de beta e gamaglobulinas e inversão da relação A/G foram relatados por GIAUFFRET (1976); GARETT (1978); KEENAN et al (1984); REITER et al (1985); SLAPPENDEL (1988); ROMDAME et al (1992); GENARO (1993); KONTOS & KOUTINAS (1993); BURILLO et al (1994); na leishmaniose visceral canina. Neste trabalho, não houve alterações marcantes nestes valores provavelmente pelo fato do tratamento ter sido instituído no início da infecção ou pelo curto tempo decorrido da infecção ao sacrifício dos cães, já que este perfil manteve-se também nos grupos A e D.

#### 4.2.5. HISTOPATOLÓGICO

As lesões encontradas nos linfonodos poplíteo e mesentérico, teste de Montenegro, baço, ponta de orelha, ponta de nariz, fígado, pulmão, rim e intestino foram classificadas de acordo com sua intensidade em leve, moderada e intensa.

Os linfonodos poplíteo e mesentérico apresentaram hiperplasia folicular, hipertrofia de cordões, espessamento de trabéculas e infiltrado linfoplasmocitário macrófágico na cápsula e tecido gorduroso pericapsular. Destacamos que este infiltrado capsular normalmente estava presente nos linfonodos parasitados. Presença de macrófagos parasitados na cápsula foi observado também por LONGSTAFFE et al (1983).

No teste de Montenegro foi observado infiltrado linfoplasmocitário macrófágico, às vezes com alguns neutrófilos, na derme superficial e profunda, dissociação e necrose das fibras do colágeno, tumefação do endotélio vascular e dilatação de linfáticos. Reação inflamatória de moderada a intensa predominava nos grupos B e C. Os achados histopatológicos assemelham-se as alterações primárias encontradas por TAFURI et al (1993) ao utilizar o Leishvacin® em leishmaniose cutânea e por GENARO (1993) no calazar canino.

No baço, proliferação de células reticulares, hipertrofia de alguns folículos e hialinização de parede da arteríola centro lobular. Estas lesões apresentavam-se de intensidade discreta a moderada distribuídas nos quatro grupos. Em dois animais do grupo controle foi observada a presença de parasitos.



Na orelha, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário macrofágico perifolicular normalmente discreto. O parasito foi encontrado em 2 animais do grupo A com infiltrado inflamatório intenso, e em 3 do grupo D (Tab. 4). Neste, o infiltrado classificava-se de discreto a intenso.

No nariz, discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário macrofágico perivascular foi encontrado em um cão de cada grupo. O parasita foi encontrado em um animal do grupo C (Tab. 4).

No fígado, infiltrado periportal linfoplasmocitário com predominância de macrófagos e alguns focos de hemossiderófagos. Este infiltrado foi encontrado em intensidade discreta em animais dos quatro grupos. No grupo controle, o parasita foi encontrado nas células de Kupffer em dois cães (Tab. 4). As lesões observadas neste órgão foram mais discretas em relação àquelas descritas por GENARO (1993) e OLIVEIRA et al (1993). Os achados são semelhantes aos descritos por KENNAN et al (1984)

No pulmão foram encontradas apenas lesões individuais em três animais do grupo A, sendo estas, hiperplasia das células do epitélio bronquiolar, infiltrado inflamatório mononuclear multifocal na parede alveolar e microgranulomas com distribuição multifocal.

Rim com aumento discreto do número de células do mesângio e espessamento da membrana basal em alguns glomérulos caracterizando uma glomerulopatia focal. Em alguns casos, presença de gotas eosinofílicas na luz dos túbulos que se aglutinavam formando cilindros. Estes achados foram observados em todos os grupos, porém com maior frequência no grupo A. Infiltrado inflamatório mononuclear intersticial focal foi encontrado em apenas um cão deste grupo. Estes resultados são mais discretos do que aqueles encontrados por TAFURI et al (1989), MANCIANTI et al (1989) e AYALA (1973), provavelmente pelo fato dos animais estarem em fase inicial das lesões decorrentes da deposição de imunocomplexos provocadas pelo calazar.

No intestino, em apenas dois cães, um do grupo B e outro do grupo C, foi observada hiperplasia do tecido linfático associado a mucosa.

Com o objetivo de observar alguma diferença estatística entre as lesões encontradas nos grupos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis nos resultados da histopatologia do linfonodo poplíteo e do teste de Montenegro. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos através deste teste

#### 4.2.6. TERAPÊUTICA

De acordo com os parâmetros analisados, os grupos B e C foram os que responderam melhor ao tratamento. Embora nos grupos B e C apenas 12,5% e 21% dos cães, respectivamente, tenham se mostrado positivos no término do experimento, não ocorreu a negatização da sorologia pela RIFI e pelo TRALd. Estes dados sugerem a permanência de um parasitismo latente, o qual não foi detectado pelo método parasitológico empregado e portanto, a não cura dos animais

Estes resultados são contrários aos observados por MANCIANTI et al (1988) que obtiveram cura de 47,2% em cães assintomáticos tratados com glucantime® contra *L. Infantum* e NEOGY et al (1994) que conseguiram cura sorológica e parasitológica em cães tratados com glucantime® associado a imunoterapia. Entretanto, são semelhantes aos obtidos por MAYRINK et al (1992) ao tratar cães naturalmente infectados com imunoquimioterapia e aos de RIERA et al (1996) que observou melhora clínica e decréscimo da sorologia com reaparecimento do parasito no linfonodo seis semanas após o tratamento com o antimoniato de N-metil glucamina.

Dois fatores poderiam ter contribuído para que o tratamento fosse eficiente: a) administração da vacina após o término da quimioterapia, onde já haveria uma diminuição do número de parasitas e a imunidade celular seria estimulada com a imunoterapia; b) adição de adjuvante na vacina.

Apesar da cura não ter sido observada, os animais apresentaram uma boa tolerância ao tratamento com o quimioterápico. Em alguns cães, durante o período de administração da droga, foi observado apenas um edema no local de aplicação do quimioterápico que regredia em aproximadamente dois dias após substituição do local de aplicação. A tolerância ao medicamento foi favorecido pelo fato dos animais apresentarem boas condições clínicas durante o tratamento, permitindo talvez uma boa eliminação da droga.

Tabela 1. Resultado da média dos diâmetros do teste intradérmico de Montenegro, parasitismo e reação de imunofluorescência 450 dias pós-infecção.

GRUPOS	ANIMAL	Média dos Diâmetros (cm)	Tecido Parasitado	RIFI
A	21	1,3	B, CB	1/640
A	24	NEG	M,B,LP,PO, CB	1/5120
A	33	1,4	-	1/160
A	44	NEG	M,B,LP,PO, CB	1/2560
A	77	1,35	-	1/640
A	79	NEG	-	1/2560
A	81	1	M,B,LP,LM	1/1280
A	87	1,2	-	1/80
B	20	NEG	LP	1/640
B	42	1,3	-	1/1280
B	78	1,8	-	1/320
B	82	2,35	-	1/160
B	86	1,8	-	1/1280
B	90	1,2	-	1/640
B	92	1,5	-	1/160
C	25	NEG	LP,PN	1/320
C	32	1,5	-	1/80
C	35	1,55	-	1/160
C	40	1,2	M	1/640
C	84	1,35	-	1/320
C	85	NEG	LM	1/160
C	89	1,55	-	1/320
D	22	NEG	M,B,LP, CB	1/10240
D	23	NEG	M,B,PO	1/1280
D	41	NEG	M,B,LP,PO,F, CB	1/640
D	43	1,25	-	1/1280
D	83	1,6	-	1/2560
D	88	NEG	B,LM	1/1280
D	93	NEG	M,B,LP,PO,F, CB	1/10240

B= baço; LP= linfonodo poplíteo; LM= linfonodo mesentérico; F= fígado; M= medula; PN= ponta de nariz; PO= ponta de orelha; CB= cultura de baço; - = não encontrado parasita

Tabela 2. Resultado do exame parasitológico de medula (esfregaço e cultura) durante o experimento

	Antes do tratamento	Primeira série do tratamento	Segunda série do tratamento	Terceira série do tratamento	150 dias depois do tratamento
GRUPO A					
21	+	-	-	+	-
24	-	-	-	-	+
33	-	-	-	-	-
44	+	+	+	+	-
77	-	-	-	+	+
79	-	+	-	-	-
81	-	-	-	+	+
87	-	-	-	-	-
GRUPO B					
20	-	-	-	-	-
34	+	-	-	★	★
42	+	-	-	-	-
78	+	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-
86	+	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-
92	+	-	-	-	-
GRUPO C					
25	+	-	+	-	-
32	-	-	-	-	-
36	+	-	-	-	-
40	+	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-
94	+	-	-	★	★
GRUPO D					
22	-	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+
43	+	-	+	+	-
80	-	-	-	★	★
83	-	-	-	+	-
88	-	-	-	-	-
93	+	-	+	+	+

★ Animal morreu durante o experimento

Tabela 3. Resultado do parasitológico de baço, fígado, linfonodos poplíteo e mesentérico, orelha e nariz em lâminas de histopatologia 450 dias pós-infecção.

	Baço	Fígado	Linf. Poplíteo	Linf. Mesentérico	Ponta de orelha	Ponta de Nariz
GRUPO A						
24	-	-	+	-	+	-
81	-	-	+	+	-	-
GRUPO C						
25	-	-	+	-	-	+
85	-	-	-	+	-	-
GRUPO D						
22	-	-	+	-	-	-
41	+	+	+	-	-	-
88	-	-	-	+	-	-
93	+	+	-	-	-	-

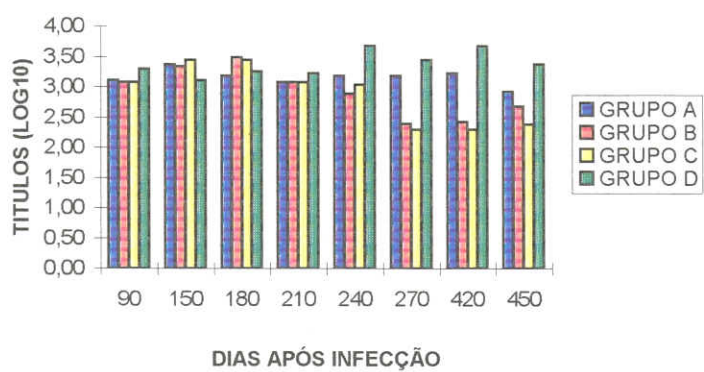


FIGURA 1. Reação de imunofluorescência indireta em cães inoculados experimentalmente e tratados contra *L. chagasi*

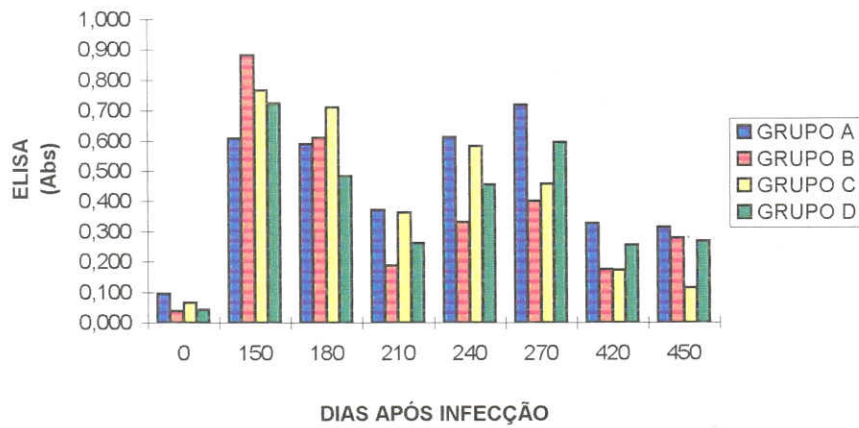


FIGURA 2. ELISA em cães inoculados experimentalmente e tratados contra *L. chagasi*

FIGURA 3A. Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* do animal 81 do grupo A tratado com imunoterapia.

















GRUPO A				
ANIMAL 81				
Dias após infecção	ELISA	RIFI	TRALd	TRALd
0	0,019	N	N	
30	0,046	N	N	
60	0,04	N	N	
90	0,3	320	P	
120	0,334	640	P	
150	0,45	10240	P	
180	0,346	5120	P	
210	0,429	10240	P	
240	0,202	20480	P	
270	0,467	20480	P	
300	0,537	10240	P	
330	0,379	10240	P	
360	0,51	10240	P	
390	0,174	10240	P	
420	0,186	20480	P	
450	0,191	1280	P	



FIGURA 3B. Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* do animal 78 do grupo B tratado com quimioterapia.

GRUPO B ANIMAL 78				
Dias após infecção	ELISA	RIFI	TRALd	TRALd
0	0,029	N	N	
30	0,019	N	N	
60	0,042	N	N	
90	0,577	1280	P	
120	0,593	2520	P	
150	0,640	10240	P	
180	0,573	10240	P	
210	0,316	1280	P	
240	0,152	1280	P	
270	0,213	160	P	
300	0,219	320	P	
330	0,192	640	P	
360	0,226	320	P	
390	0,053	320	P	
420	0,075	160	P	
450	0,061	320	P	

FIGURA 3C. Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* do animal 85 do grupo C tratado com imunoterapia.

GRUPO C				
ANIMAL 85				
Dias após infecção	ELISA	RIFI	TRALd	TRALd
0	0,031	N	N	
30	0,037	N	N	
60	0,048	N	N	
90	0,405	640	P	
120	0,342	1280	P	
150	0,558	1280	P	
180	0,488	5120	P	
210	0,449	1280	P	
240	0,308	1280	P	
270	0,226	320	P	
300	0,275	80	P	
330	0,152	320	P	
360	0,176	160	P	
390	0,096	160	P	
420	0,077	160	P	
450	0,073	160	P	

FIGURA 3D. Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* do animal 41 do grupo controle.

GRUPO D				
ANIMAL 41				
Dias após infecção	ELISA	RIFI	TRALd	TRALd
0	0,024	N	N	
30	0,02	N	N	
60	0,025	N	N	
90	0,299	640	P	
120	0,323	160	P	
150	0,364	1280	P	
180	0,402	2560	P	
210	0,336	2560	P	
240	0,218	20480	P	
270	0,505	1280	P	
300	0,387	1280	P	
330	0,308	5120	P	
360	0,489	5120	P	
390	0,168	1280	P	
420	0,194	5120	P	
450	0,165	640	P	

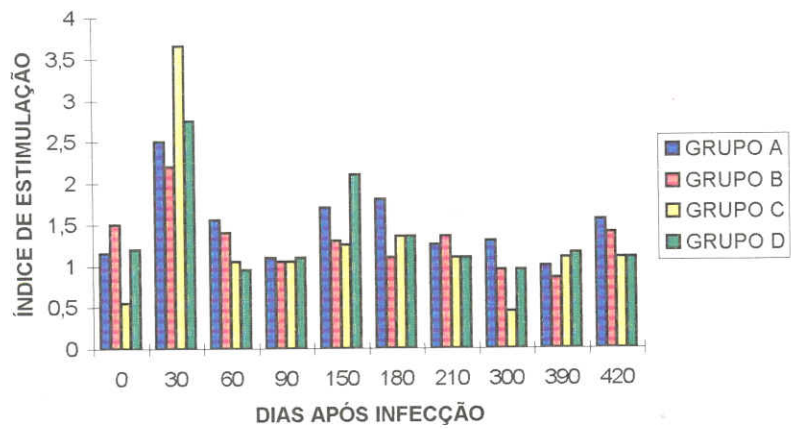


FIGURA 4. Resposta proliferativa de linfócitos em cães inoculados experimentalmente e tratados contra *L. chagasi*

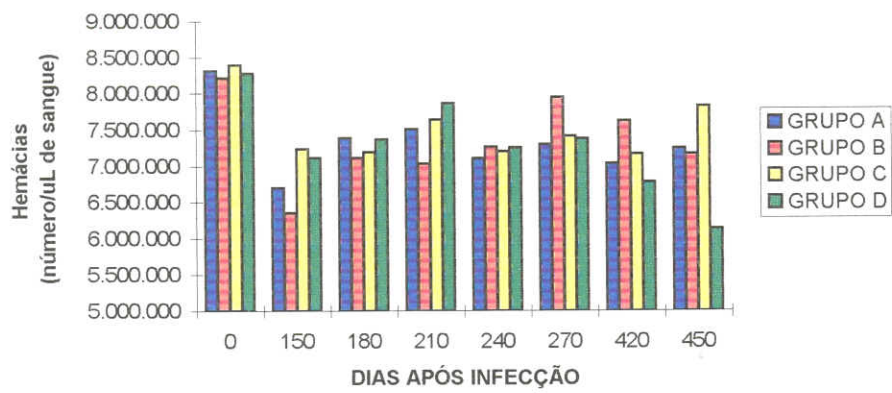


FIGURA 5. Valor médio de hemácias em cães inoculados experimentalmente e tratados contra *L. chagasi*.

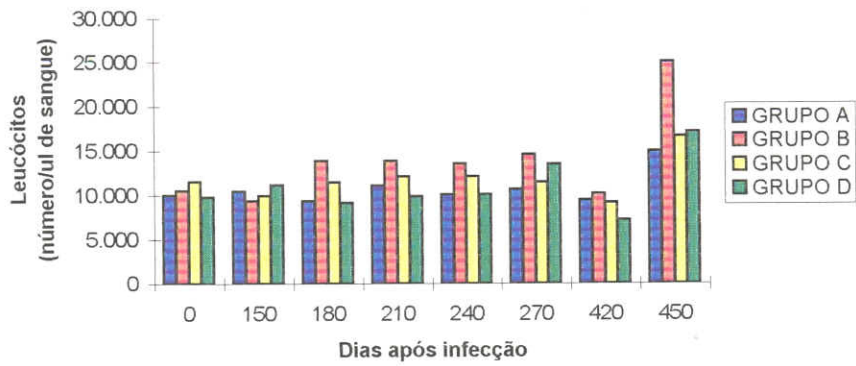


FIGURA 6. Valor médio de leucócitos em cães inoculados experimentalmente e tratados contra *L. chagasi*.

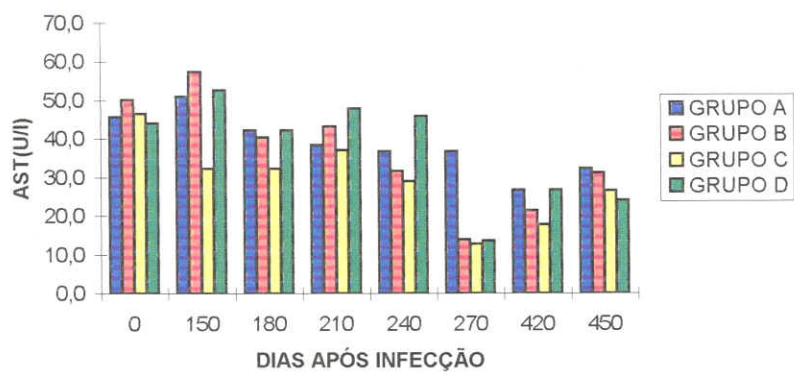


FIGURA 7. Valor médio da aspartato aminotransferase em cães inoculados experimentalmente e tratados contra *L. chagasi*.

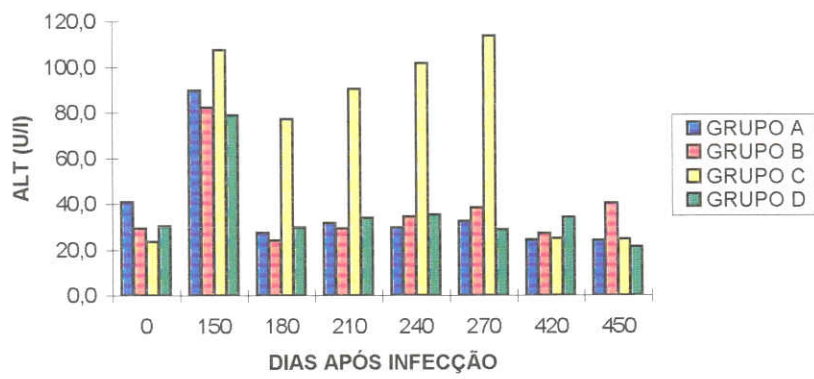


FIGURA 8. Valor médio da alanino aminotransferase em cães inoculados experimentalmente e tratados contra *L. chagasi*.



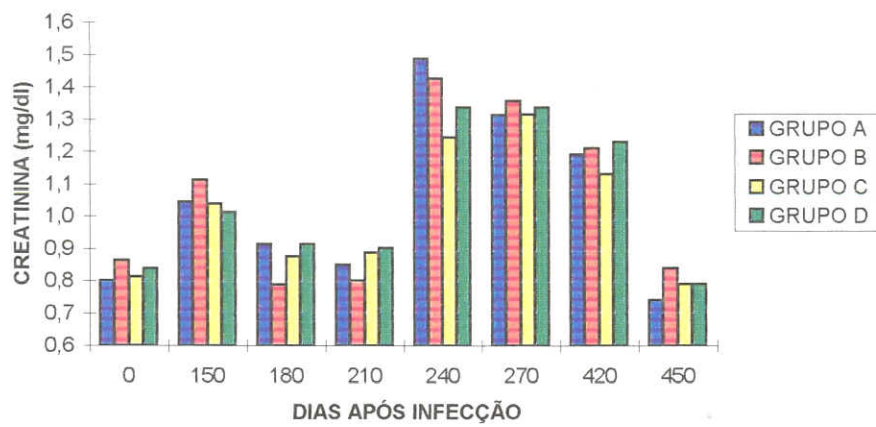


FIGURA 9. Valor médio da creatinina em cães inoculados experimentalmente e tratados contra *L. chagasi*.

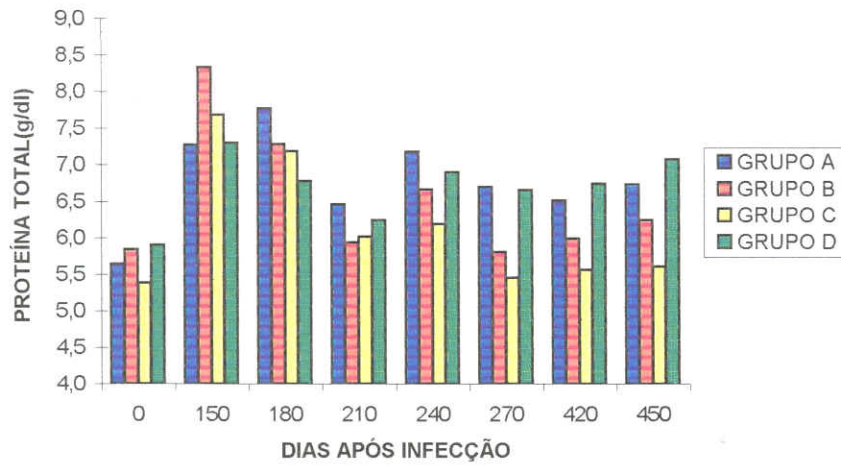


FIGURA 10. Valor médio da proteína total em cães inoculados experimentalmente e tratados contra *L. chagasi*.

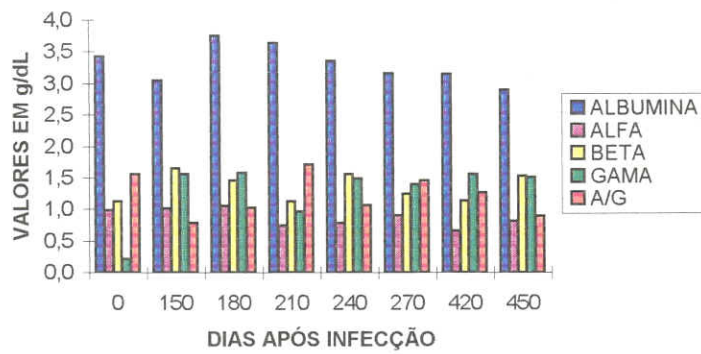


FIGURA 11a. Valores das frações protéicas do grupo A tratado com imunoterapia contra *L. chagasi*.

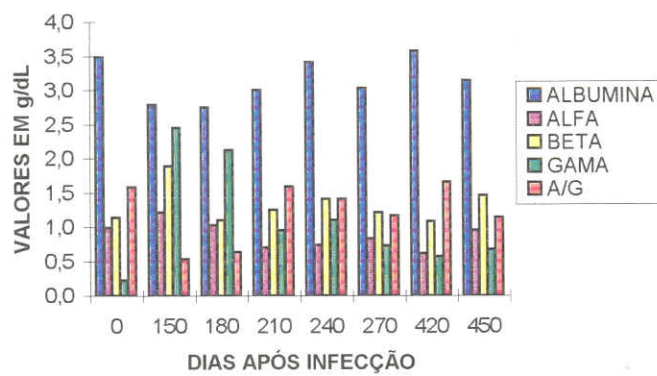


FIGURA 11b. Valores das frações protéicas do grupo B tratado com quimioterapia contra *L. chagasi*.

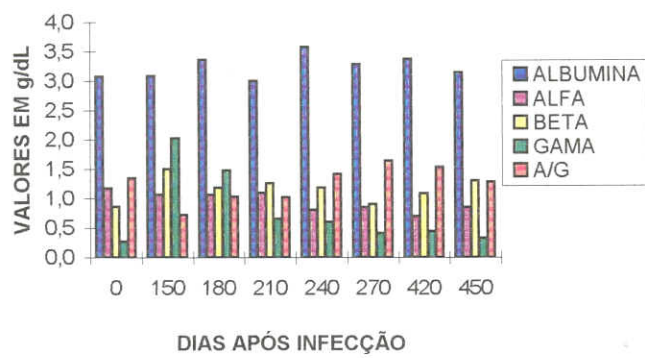


FIGURA 11c. Valores das frações protéicas do grupo C tratado com imunoterapia contra *L. chagasi*.

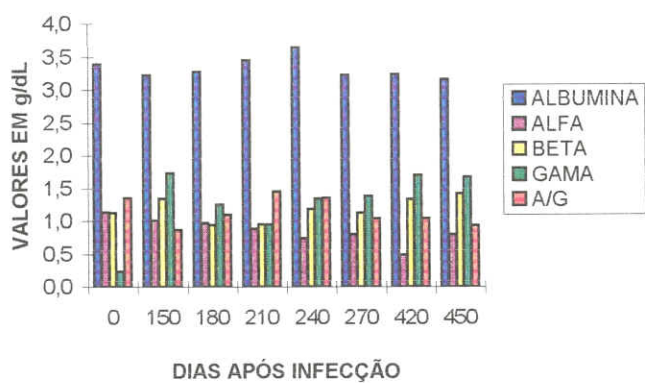


FIGURA 11d. Valores das frações protéicas do grupo D controle.

## 5. CONCLUSÕES

1. Houve negatificação do parasitismo em 12,5% dos cães do grupo submetido a quimioterapia e 21% dos cães do grupo submetido a imunoquimioterapia porém não é possível considerar cura parasitológica pelo fato dos níveis de anticorpos serem mantidos nos animais, ainda que em níveis menores do que antes do tratamento. A persistência de anticorpos anti- *Leishmania chagasi* foi confirmada através do teste rápido anticorpo *Leishmania donovani* (TRALd).
2. A ausência de adjuvante pode ter sido um dos fatores que não permitiu que a vacina fosse eficiente no tratamento;
3. O antimônio é bem tolerado em animais em início de infecção e que apresentem um bom estado clínico.

## 6.SUMMARY

Key-words: treatment, immunochemotherapy, dog, visceral leishmaniasis

The available drugs for treatment of human visceral leishmaniasis do not promote cure of the dogs. Whereas new drugs are not available for use in dogs, it is necessary to test therapeutic trials using old drugs in association with other agents. The objective of this experiment was to test the therapeutic efficacy of the Glucantime® in association with an antigenic extract from *Leishmania braziliensis* in asymptomatic dogs experimentally infected. Thirty-two laboratory reared mongrel dogs were infected with amastigotes of *L. chagasi*. During 450 days, the follow up was done by specific antibody detection, cellular immune response, hematology, biochemical serology and detection of the parasite in bone marrow and skin. After the confirmation of the infection by antibody or parasite detection, the dogs were randomly allocated in four groups of eight animals each: Group A, received antigen (500 µg/day); Group B, received Glucantime® (100 mg/Kg/day); Group C, received the antigen plus Glucantime® and group D received no treatment. All dogs were killed and necropsied 450 days after inoculation. Bone marrow aspirate, spleen, popliteal lymph node, skin from ear were collected and stained with giemsa for microscopic examination. Tissue samples of skin from nose, ear, mesenteric and popliteal lymph nodes, kidney, spleen and liver were processed by conventional method and stained with H & E. Spleen samples were inoculated into culture tubes containing NNN/LIT. Thirteen dogs were infected. The antimonial was able to reduce the antibody levels and the parasitism but the dogs were not cured.



## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P., SANTOS-GOMES, G., RACHAMIM, N. et al. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v. 13, p. 537-550, 1991.
- ADLER, S., TCHERNOMORETZ, I. Failure to Cure Natural Canine Visceral Leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* v.40, p.320-324,1946.
- ALENCAR, J.E. Leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Med. Univ. Fed. Ceará*, v. 17/18, p.129-148,1977/78.
- ALENCAR, J.E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo*, v.3, n.4, p.175-180, 1961.
- AYALA, M.A.R. Alterações renais no calazar canino espontâneo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*,v. 8, n.6, p.353-358,1973.
- BADARÓ, R., BENSON, D., EULÁLIO, M.C. et al. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect Dis.*, v.173, p.758-761, 1996.
- BELLOLI, C.; CECI, L.; CARLI, S. et al. Disposition of antimony and aminosidine in dogs after administration separately and together; implications for therapy of leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*,v.58, p.123-127, 1995.
- CAMARGO, M.E., REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *Am. J. Trop. Med Hyg.*, v.18, p.500 - 505, 1969.
- CARVALHO, E.M., BACELLAR, O.A., REED, S. et al. Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to

activate macrophages to kill *Leishmania*. **Bras. J. Med. Biol. Res.** v.21,p.85-92,1988.

CARVALHO, E.M., BADARÓ, R., EULÁLIO, M.C. et al. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.** v.76, p.2066-2069,1985.

CECI, L., PETAZZI, F. Aspetti Immunolettroforetici Della Leishmaniosi Canina - Iimmunolectrophoretic Aspects of Canine Leishmaniasis. **Atti Soc. Ital. Scie. Vet.** v.37, p.394-396,1983.

CHAPMAN, W.L.; HANSON, W.L.; ALVING, C.R. et al Antileishmanial activity of liposome-encapsulated meglumine antimonate in the dog. **Am. J. Vet Res.**, v.45, n.5, p.028-1030,1984.

COSTA, C.A da., MICHALICK, M.S.M., MELO, M.N., et al. Estudo comparativo entre meios de cultura para isolamento de leishmanias. **Rev. Farm. Bioquim.**, v.5, n.1, p.13-20, 1983.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v.14,n.5,p.417-423,1996.

EUZEBY, J. Thérapeutique de la Leishmaniose Générale du Chien. Actualité - Perspectives. **Rev. Méd. Vét.** v.133, n.6, p.383-390,1982.

FRANC, M. La Leishmaniose Canine. **Rev. Méd. Vét.** v.169, n.5/6, p.433-437,1993.

GARETT, A. Visceral Leishmaniasis. **South. Pathol.**, v.31, n.2, p.125-128,1978.

GENARO, O. *Leishmaniose visceral canina experimental*. Belo Horizonte-MG: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1993. 202p. Tese (doutorado).

GENARO, O, CONCEIÇÃO-SILVA, F., NOGUEIRA, R.S. et al. Evaluation of the cellular immune response in dogs naturally and experimentally Infected with *Leishmania chagasi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Supl., v.88, p..226, 1993.

GIAUFFRET, A.; SANCHIS, R., VITU, C. Les Exames de Laboratoire dans la Leishmaniose canine. **Rev. Méd. Vet.**, v.127, n.6, p.913-930, 1976.

- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; ORSINI, S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime®) of *L. infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.86, n.6, p.613-620, 1992.
- GRIMALDI JR, G., TESH, R.B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.6, n.3, p.230-250, 1993.
- HAILU, A. Pre- and post-treatment antibody levels in visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.84, p.673-675, 1990
- JAIN, N. C. *Essentials of Veterinary hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993. 417p.
- KIRK, RW. *Atualização terapêutica veterinária*. São Paulo:1984. 1495p.
- KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd Dog. I. Infection, Clinical Disease, and Clinical Pathology. **Vet. Pathol.** v.21, p.74-79, 1984a.
- KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L. et al. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd Dog. II. **Vet. Pathol.** v.21, p.80-86, 1984b.
- KONTOS, V.J., KOUTINAS, A.F. Old world canine leishmaniasis. **Small Anim.**, v.15, n.7, p.949-959, 1993.
- LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; PERIERES, J. et al. Ecologie de Leishmanioses dans le Sud de la France. 10. Les Formes Évolutives de la Leishmaniose Viscérale Canine. Elaboration d'une Typologie Bioclinique à Finalité Épidémiologique. **Ann. Parasitol.** v.54, n.3, p.277-295, 1979.
- LIMA, W.S., DIAS, M.; COSTA, C.A. et al. Histopatologia e Terapêutica da Leishmaniose Tegumentar Canina, Naturalmente Adquirida. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.38, n.1, p.33-41, 1986.
- LONGSTAFFE, J.A., GUY, M.W. Leishmaniasis in dogs. **Vet Annual**, v.25, p.358-367, 1985.

- LONGSTAFFE, J.A.; JEFFERIES, A.R.; KELLY, D.F. et al. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potential human health hazard. *J. Small Anim. Pract.*, v.24, p.23-30, 1983.
- MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. et al. 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, p.566-567, 1988.
- MANCIANTI, F.; POLI, A.; BIONDA, A.. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitologia*, v.31, p.213-230, 1989.
- MANUAL de Controle da Leishmaniose Visceral (WHO/LEISH/96.40). Brasília: WHO/OPAS, 1997, 86p.
- MARTÍNEZ-MORENO, A., MARTÍNEZ-CRUZ, M.S., BLANCO, A., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S. Immunological and histological study of T - and B - lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, v.51, p.49-59, 1993.
- MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological Findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.80, n.3, p.349-357, 1985.
- MAYRINK W., GENARO, O., COSTA, C.A. et al. Combined immunotherapy and chemotherapy in canine visceral leishmaniasis preliminary findings. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.87, Supl.2, p.201, 1992.
- MAYRINK W., GENARO, O., FRANÇA-SILVA, J.C. et al. Protection against canine visceral leishmaniasis by using a vaccine composed of killed promastigotes of *Leishmania braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.89, Supl.1, p.179, 1994.
- NEOGY, A.B.; NANDY, A.; DASTIDAR, B.G. et al. B lymphocyte population and immunoglobulins in indian kala-azar in response chemotherapy. *Acta Trop.*, v.43, p.237-244, 1986

- NEOGY, A.B.; VOULDOUKIS, I.; COSTA, J.M. DA. et al. Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol*, v.54, p.367-373, 1994.
- OLIVEIRA, G.G.S., SANTORO, F., SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.88, n.2, p.243-248, 1993.
- OLLIARO, P. L., BRYCESON, A. D. M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol. Today*, v.9, n.9, p.323-328, 1993.
- PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J. et al. Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. and Immun.*, v.62, n.1, p.229-235, 1994.
- RIERA, C.J.E., VALLADARES, M.G., AISA, M.J. et al. Experimental model of canine leishmaniasis. Serological and parasitological follow-up before and after chemotherapy. *Parassitologia*, v.38:1-2, 320, 1996.
- ROMDANE, M.N.; BEN ROMDHANE, S; JEMLI, M.H. et al. Profills Électrophorétiques dans la Leishmaniose Canine. *Rev. Méd. Vet.*, v.143, n.10, p.753-756, 1992.
- SAS - **USER'S GUIDE**: Statistical. Cary: SAS Institute Inc., 1995.
- TAFURI, W.L., RASO, P., HERMETO, M.V. et al. Estudo histopatológico comparativo do teste cutâneo em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar, utilizando dois antígenos: Leishvacin e o P10.OOOG. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* n.26, v.1, p.11-14, 1993.
- TAFURI, W.L., MICHALICK, M.S.M., GENARO, O. et al. Estudo, ao microscópio óptico e eletrônico, do rim de cães natural e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.31, n.3, p.139-145, 1989.
- TASSI, P.; ORMAS, P.; CARLI, S. et al. Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res. Vet. Scie.*, v.56, p.144-150, 1994.

THAKUR, C. P. Un programa de lucha contra el kala-azar en comunidades tribales apartadas. *Foro Mundial Salud*, v.15, n.3, p.269-271, 1994.

TRYPHONAS, L; ZAWIDZKA, Z; BERNARD, M.A. et al. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Can. J. Comp. Med.*, v.41, p.1-12, 1977.

WHO guidelines for leishmaniasis control at regional and subregional levels (WHO/LEISH/88-25). Geneva: PDP/WHO, 1988.

UFMS - ESCOLA DE VETERINÁRIA - BIBLIOTECA

Doação de Colégio dos Cursos  
de Pós Grad. Preço 57,00  
Data 01/04/97