



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: PERFIS CLÍNICO,
HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO E HUMORAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS, TRATADOS OU VACINADOS**

São Luís/MA

2019

LUCÉLIA TEIXEIRA FRANÇA

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: PERFIS CLÍNICO,
HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO E HUMORAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS, TRATATADOS OU VACINADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal CMCA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo
Coorientadora: Profa. Dra. Flávia de Oliveira Cardoso

São Luís/MA

2019

LUCÉLIA TEIXEIRA FRANÇA

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: PERFIS CLÍNICO,
HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO E HUMORAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS, TRATADOS OU VACINADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal CMCA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

São Luís - MA: 25 de Fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo (Orientador)

Departamento de Patologia / CCA / UEMA

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva (1º Membro)

Departamento de Patologia / CCA / UEMA

Profa. Dr. José Gomes Pereira (2º Membro)

Departamento de Patologia / CCA / UEMA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui, sendo sempre meu guia na busca da concretização dos meus sonhos e objetivos. Por não me desamparar um segundo sequer, e em meio a tantos obstáculos, segurou a minha mão e me mostrou o caminho.

Agradecer à minha família por ser a minha base e sempre estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando nessa jornada. Em especial à minha avó Maria Elza, minha mãe, minha irmã Thalyana, minha tia Maria de Jesus, meu tio Anselmo e Gabriel, obrigada por todo carinho, amor e dedicação dada a mim durante todos esses anos. Ao meu Pai pelas demonstrações de carinho e amor, à minha avó Áurea Frazão pelas histórias contadas, pelas conversas e pelos tantos risos que demos juntas (*in memoria*) e a todos os familiares pelas energias positivas, pelo afeto e por torcerem por mim e pelo meu engrandecimento pessoal e profissional. Amo vocês!

À Andressa Nunes, minha grande companheira, que acompanhou cada degrau alcançado até aqui, sempre me apoiando em minhas decisões, me amparando nos momentos difíceis, sendo paciente comigo nos momentos de estresse e me dando o gás necessário para seguir em frente.

Aos meus amigos que apesar da ausência estarão sempre em meu coração: Aleska, Ana Clara, Diego, Luciana, Semaías e Thalyta, em especial à Ana Beatriz, Ana Eliza onde permanecemos juntas na pós-graduação estreitando ainda mais nossa amizade. Às parceiras da “casa das meninas”, Renata Mondego, Taynan e Eliza, pela companhia, conselhos, brincadeiras e risos durante todos esses meses, amenizando um pouco a saudade dos familiares durante a viagem em experimento. À Wélida e João pelas palavras de incentivo, apoio, confiança e amizade sincera.

Ao meu orientador, Professor Dr. Ferdinan Melo, pela orientação, competência e confiança depositada sobre mim no decorrer desses anos. Por me acolher no Laboratório de Imunodiagnóstico – LABIMUNO/UEMA durante todos esses anos, me auxiliando na busca contínua pelo conhecimento; e a todos que fazem parte dessa equipe, Doutoranda Carla Rebouças e Me. Cristian Aquino, muito obrigada!

À Professora Dra. Flávia de Oliveira Cardoso por ter assumido a minha coorientação, todo o meu respeito, gratidão e admiração. Quem me acolheu na Instituição Oswaldo Cruz/RJ e com toda paciência do mundo, segurou a minha mão e

me mostrou o caminho, me tranquilizando sempre e mostrando que eu era capaz. Por não ter medido esforços para me ajudar, pela motivação e por todo o conhecimento compartilhado durante esses meses. Obrigada por tudo!

À Professora Dra. Ana Lúcia de Abreu Silva pelo apoio e suporte indispensável na viagem para concretização do experimento. Minha profunda gratidão e respeito.

Aos que me ajudaram ativamente no decorrer do projeto, através das coletas, em especial aos amigos Wallyson Galvão e Leandro Ribeiro, agradeço por toda a paciência e ajuda, vocês foram essenciais.

A todos os animais que serviram de objeto de estudo para a realização desse trabalho e seus tutores, bem como ao Hospital Veterinário da UEMA, Clínica Veterinária Santos, em especial ao Dr. Astolfo Santos, Dra. Oaiana e Dra. Natássia; e a Dra. Karoline Moraes.

Ao Instituto Oswaldo Cruz/RJ, mais precisamente ao Laboratório de Imunomodulação e protozoologia/IOC-FIOCRUZ, na figura da Dra. Kátia Calabrese, por me receber de portas abertas, ter me dado a oportunidade de conhecer e conviver com pesquisadores incríveis, permitir a execução do meu experimento e a todas as amizades que fiz durante esse período: Fernando, Tania, Celeste, Dayanne, Sandy, Luzilene, Yasmin, Mariana, Juan, João.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão-FAPEMA pela concessão da bolsa para a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal - UEMA, na pessoa da Coordenadora Profa. Dra. Alana Lislea e todos os envolvidos, pelo auxílio e ajuda sempre que solicitado, pela oportunidade e ensinamentos transmitidos.

Aos meus mestres, professores, por terem compartilhado aprendizado, ajudando tanto na minha formação acadêmica, como também na minha formação pessoal, muito obrigada!

Por fim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que torceram por mim, que acreditaram nesta conquista e que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença crônica de caráter sistêmico, sendo considerada uma das principais zoonoses difundidas mundialmente. É causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, tendo o cão doméstico como o principal reservatório desta enfermidade. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o perfil clínico, hematológico, bioquímico e humoral de cães naturalmente infectados, vacinados ou tratados contra a Leishmaniose visceral canina (LVC). Foram coletadas amostras de sangue de 40 animais provenientes do Hospital Universitário Veterinário - UEMA, clínicas veterinárias particulares e residências, os quais foram divididas em 4 grupos: grupo 1 - 10 cães positivos para LVC e sintomáticos; grupo 2 - 10 cães positivos e assintomáticos; grupo 3 - 10 cães positivos e submetidos à terapia com Miltefosina e grupo 4 - 10 cães saudáveis e vacinados contra a LVC. Para confirmação do diagnóstico da LVC foram empregados teste parasitológico (esfregaço medular) e testes sorológicos como a Reação de imunofluorescência indireta (IFI) e Ensaio imunoenzimático (ELISA indireto). Em todas as amostras de sangue coletadas foram realizados testes hematológicos (hemograma completo), bioquímicos (dosagem de ureia, creatinina, ALT, AST, FA, proteínas totais e frações), assim como dosagem de imunoglobulinas (IgG total, IgG1, IgG2 e IgE). Alterações hematológicas e bioquímicas como anemia (70%), trombocitopenia (70%), hiperproteinemia (50%), seguida de hiperglobulinemia (50%) e hipoalbuminemia (40%), associados à disfunção renal (60%) e hepática (60%) foram as mais evidenciadas nos cães pertencentes ao grupo sintomático. Nos cães tratados com Miltefosina, observou-se um padrão variável, havendo melhora e piora clínico-laboratorial em relação a alguns parâmetros avaliados após o tratamento. Nos cães saudáveis e vacinados os exames após a vacinação apresentaram-se dentro da normalidade com aumento dos níveis de linfócitos (90%) e proteínas plasmáticas (70%) quando comparados aos exames anteriores à vacinação.

Palavras-chave: Leishmaniose. Imunoglobulinas. Terapia. Cão.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a chronic disease of a systemic character, being one of the main zoonoses spread worldwide. It is a protozoa belonging to the *Leishmania* genus, with the dog as the main reservoir of the disease. In this context, the present study aimed to evaluate the clinical, hematological, biochemical and humoral profile of dogs naturally infected, vaccinated or treated against canine visceral leishmaniasis (LVC). Blood samples were collected from 40 animals from the University Veterinary Hospital - UEMA, private veterinary clinics and residences, divided into 4 groups: group 1 - 10 dogs positive for LVC and symptomatic; group 2 - 10 positive and asymptomatic dogs; group 3 - 10 positive dogs and submitted to therapy with Miltefosine and group 4 - 10 healthy dogs and vaccinated against LVC. To confirm the LVC diagnosis, parasitological tests (medullary smear) and serological tests such as indirect immunofluorescence (IFI) and Enzyme – Linked Immunosorbent. Hematological tests (complete blood count), biochemical tests (urea dosage, creatinine, ALT, total proteins and fractions), as well as immunoglobulins (IgG total, IgG1, IgG2 e IgE) were performed in all blood samples. Hematologic and biochemical alterations, such as anemia (70%), thrombocytopenia (70%), hyperproteinemia (50%), hyperglobulinemia (50%) and hypoalbuminemia (40%) were associated with renal (60%) and hepatic were the most evident in dogs belonging to the symptomatic group. In dogs treated with Miltefosine, a variable pattern was observed, with clinical and laboratory improvement and worsening in relation to some parameters evaluated after treatment. In healthy and vaccinated dogs, post-vaccination examinations were within normal limits with increased lymphocyte (90%) and plasma protein (70%) levels compared to pre-vaccination exams.

Key words: Leishmaniasis. Immunoglobulins. Therapy. Dog.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição mundial da leishmaniose visceral, 2015	15
Figura 2 – Casos de leishmaniose visceral nos países com maior número de casos nas Américas, 2001-2016	16
Figura 3 – Distribuição de casos de leishmaniose visceral no Brasil, 2015.....	17
Figura 4 – Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.	19
Figura 5 – Fêmea de Flebotomíneo adulto, engurgitada	20
Figura 6 – Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	22
Figura 7 – Mapa de localização da Cidade de São Luís, Maranhão, Brasil	31
Figura 8 – Sinais clínicos apresentados por cães sintomáticos positivos para leishmaniose visceral, São Luís, Maranhão, 2018	41
Figura 9 – Frequência de sinais clínicos concomitantes observados em cães positivos para leishmaniose visceral	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Números absolutos e porcentagens de cães infectados por <i>Leishmania</i> spp. relacionados as variáveis raça, sexo e faixa etária	39
Tabela 2 – Sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral canina sintomáticos e submetidos ou não a tratamento com a Miltefosina	40
Tabela 3 – Média dos valores hematológicos dos cães positivos assintomáticos, sintomáticos e sadios	45
Tabela 4 – Média dos valores bioquímicos dos cães positivos assintomáticos, sintomáticos e sadios	46
Tabela 5 – Média dos valores hematológicos dos cães positivos antes e após o tratamento com Miltefosina.....	48
Tabela 6 – Média dos valores bioquímicos dos cães positivos antes e após o tratamento com Miltefosina	49
Tabela 7 – Resultado do hemograma completo de cães com leishmaniose visceral, sintomáticos	47
Tabela 8 - Resultado dos testes bioquímicos séricos para avaliação das funções renal e hepática de cães com leishmaniose visceral, sintomáticos	46
Tabela 9 – Resultado do hemograma completo de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos	48
Tabela 10 – Resultado dos testes bioquímicos séricos para avaliação das funções renal e hepática de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos	49
Tabela 11 - Resultado do hemograma completo de cães com leishmaniose visceral antes e após terapia com Miltefosina	52
Tabela 12 – Resultado do perfil plaquetário de cães com leishmaniose visceral antes e após terapia com Miltefosina	53
Tabela 13 – Resultado dos testes bioquímicos séricos para avaliação das funções renal e hepática de cães com leishmaniose visceral antes e após terapia com Miltefosina	54
Tabela 14 – Resultado do hemograma completo de cães sadios antes e após vacinação com Leish-Tec®	56
Tabela 15 – Resultado do perfil plaquetário de cães sadios antes e após vacinação com Leish-Tec®	57

Tabela 16 – Resultado dos testes bioquímicos séricos para avaliação das funções renal e hepática de cães saudáveis antes e após vacinação com Leish-Tec®..... **58**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
CRD	Com raça definida
DPP	<i>Dual path Platform</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
GA	Grupo de cães positivos assintomáticos
GS	Grupo de cães positivos sintomáticos
GT	Grupo de cães positivos tratados
GV	Grupo de cães negativos e vacinados
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PBS	Tampão fostato-salino
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SFB	Soro Fetal Bovino
SRD	Sem raça definida
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
µL	Microlitro
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Histórico	14
2.2 Epidemiologia	15
2.3 Etiologia	18
2.4 Transmissão	19
2.5 Ciclo Biológico e Patogenia	21
2.6 Resposta imunológica	22
2.7 Sinais clínicos	24
2.8 Diagnóstico	25
2.9 Tratamento	26
2.10 Controle e profilaxia	28
3 OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Área de estudo	31
4.2 Animais	31
4.2.1 Avaliação dos animais do grupo tratado com Miltefosina	
4.2.2 Avaliação dos animais do grupo vacinado com Leish-tec®	
4.3 Colheita e preparação de material para análise	33
4.3.1 Colheita de sangue total	33
4.3.2 Colheita e processamento de soro sanguíneo	33
4.4 Diagnóstico da Leishmaniose visceral	
4.4.1 Exame Parasitológico	34
4.4.2 Exames sorológicos	34
4.4.2.1 Reação Imunofluorescência Indireta (RIFI)	34
4.4.2.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA indireto)	35
4.5 Dosagem de Imunoglobulinas	
4.5.1 Preparo de antígeno solúvel de <i>Leishmania infantum</i>	35
4.5.2 Dosagem de proteínas e antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>	36

4.5.3 Sensibilização da placa de 96 poços	37
4.5.4 Ensaio imunoenzimático (ELISA) – dosagem de imunoglobulinas	37
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1 Triagem dos Animais	39
6.2 Exame clínico	40
6.3 Hemograma completo e análises bioquímicas dos cães positivos para leishmaniose visceral e sintomáticos	42
6.4 Hemograma completo e análises bioquímicas dos cães positivos para leishmaniose visceral e assintomáticos	47
6.5 Hemograma completo e análises bioquímicas dos cães positivos para leishmaniose visceral antes e após terapia com Miltefosina	50
6.6 Hemograma completo e análises bioquímicas dos cães sadios antes e após vacinação com Leish-Tec®	55
7 CONCLUSÕES PARCIAIS	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas de caráter crônico, difundidas mundialmente, apresentando características epidemiológicas, biológicas e formas clínicas distintas (ROSS, 1903). São causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e transmitidas através da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). De acordo com a espécie envolvida e as manifestações clínicas, as leishmanioses podem ser divididas em duas principais formas: leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral (LV).

A leishmaniose tegumentar concentra a maior frequência de casos, no entanto, a leishmaniose visceral, em decorrência de suas complicações, se não tratada, pode evoluir a óbito (OPAS, 2017).

A incidência desta enfermidade se estende por 98 países de clima tropical, subtropical e temperado (OPAS, 2017). Em 2015, foram reportados 197.552 novos casos de leishmaniose cutânea e 22.187 novos casos de leishmaniose visceral pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O Brasil juntamente com a Índia apresentam mais de 50% dos casos de leishmaniose visceral globalmente (WHA, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a LV é considerada uma das seis principais doenças tropicais, dada a sua distribuição, incidência e alta letalidade em indivíduos não tratados. A leishmaniose visceral já foi relatada em 76 países do mundo, sendo considerada endêmica em 12 países das Américas, onde cerca de 96% dos casos reportados nessa região estão concentrados no Brasil. No período de 2001-2016 foram relatados 55.530 casos humanos de LV nas Américas com uma média anual de 3.457 casos (WHO, 2017).

Os cães, assim como os seres humanos, são acometidos pela leishmaniose visceral, sendo considerados os principais reservatórios dessa enfermidade, podendo atuar como fonte de infecção, visto que há uma interação afetiva direta entre essas espécies (MARCONDES; ROSSI, 2013).

A leishmaniose visceral canina (LVC) tem se tornado uma preocupação na área da saúde pública devido à sua rápida distribuição geográfica, aumento da incidência de casos, variedade de sinais clínicos apresentados por esses animais e risco de morte, se não diagnosticado e tratado precocemente. É estimado que 2.5 milhões de

cães estejam infectados apenas na Bacia do Mediterrâneo (MORENO & ALVAR, 2002).

A Organização Mundial da Saúde e a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) até o ano de 2015 recomendavam a eutanásia dos cães soropositivos como medida de controle da doença. No entanto, em 2016, o Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, autorizou a comercialização da Miltefosina (Milteforan®) para tratamento de cães positivos. No entanto, uma reavaliação periódica deve ser realizada para que se tenha um acompanhamento da evolução ou progressão clínica desses animais.

A imunização de cães, juntamente com a utilização de coleiras repelentes e controle da população errante são algumas medidas de prevenção que devem ser adotadas, a fim de evitar a contaminação de animais sadios, reduzindo, portanto, os índices de disseminação da doença.

A LVC é uma problemática enfrentada na cidade na cidade de São Luís/MA - Brasil, dada à alta incidência da enfermidade nesta região, bem como ausência de políticas públicas voltadas para as medidas de controle e prevenção da doença, dificuldade de diagnóstico precoce e seguro e ausência de terapias eficazes.

A resposta imunológica do organismo animal frente à leishmaniose visceral canina ainda não foi completamente elucidada. O papel das imunoglobulinas vem sendo estudado para que se consiga compreender as suas funções e a correlação entre seus títulos e as formas clínicas apresentadas pelo animal e a progressão ou resistência à infecção. Além disso, devido à ausência de estudos que avaliam a cinética dessas imunoglobulinas após o tratamento de cães positivos submetidos à terapia com a Miltefosina, o presente trabalho objetivou avaliar o perfil clínico, hematológico, bioquímico e humoral de cães naturalmente infectados, vacinados ou tratados contra LVC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A Leishmaniose visceral (LV) foi descrita pela primeira vez no ano de 1835, na Grécia, onde passou a ser conhecida como “ponos” (Deus da dor, na mitologia grega). Em 1869, na Índia, novos casos da doença começaram a aparecer. No Ano de 1900, em Bengal, na Índia, William Boog Leishman identificou a presença de um protozoário no baço de um soldado que foi a óbito, recebendo inicialmente o nome de “Kala-jwar” (febre negra) ou “Kala-azar” (Calazar) em virtude da febre e pigmentação exacerbada em pacientes acometidos pela enfermidade (MARZOCHI, 1981).

Em 1903, Donovan identificou a presença do agente etiológico em aspirados esplênicos de uma criança que apresentava episódios de febre irregular. O parasito foi cultivado primeiramente por Rogers, em 1904, em sangue citratado, onde observou nas culturas que o parasito apresentava forma flagelada. Em 1908, na Tunísia, Nicolle e colaboradores encontraram parasitos em cães, sugerindo a partir de então, a importância desses animais como reservatório da doença. No entanto, foi somente em 1931 que os flebotomíneos foram incriminados como vetores (MICHALICK e GENARO, 2005).

O primeiro relato da LV autóctone no Brasil foi registrado por Migone, no Paraguai, em 1913, após a necropsia de um paciente oriundo de Boa Esperança, no Mato Grosso (ALENCAR et al., 1991). Nas regiões Norte e Nordeste os primeiros registros da enfermidade ocorreram em 1934, por Henrique Penna, a partir de lâminas histológicas provenientes de tecido hepático (viscerotomia) de pacientes *post mortem* para diagnóstico de febre amarela (LAINSON et al., 1986; GENARO, 2000; SILVA, 2007).

Deane e Mangabeira, em 1954, incriminaram o *Lutzomyia longipalpis* como a espécie vetora responsável pela transmissão da *Leishmania chagasi*, devido sua constante presença ao redor e no interior das residências de pacientes doentes (CHAGAS, 1936; RANGEL e LAINSON, 2003). Posteriormente, em 1956, Deane em estudos pioneiros sobre o ciclo de transmissão da doença no Brasil culminaram com a incriminação da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatório silvestre e na confirmação do papel do cão como importante reservatório doméstico desta enfermidade (BADARÓ & DUARTE, 1986).

No Estado do Maranhão, a primeira descrição da leishmaniose se deu em 1964, por Fiquene, o qual relatou 53 casos de leishmaniose através de viscerotomias e 2 casos autóctones no município de São José de Ribamar, na Ilha de São Luís. Posteriormente, em 1982, 39 casos autóctones de LV foram diagnosticados, instalando-se, assim, uma endemia com expansão da doença para outras regiões da cidade e do Estado (SILVA et al., 1986).

2.2 Epidemiologia

A leishmaniose é uma zoonose distribuída mundialmente, já tendo sido relatada na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas, totalizando 98 países nos cinco continentes (Figura 1) (ALVAR et al., 2012). Estima-se o aparecimento de cerca de 1,3 milhão de novos casos da doença por ano, dos quais 200 a 400 mil são referentes à leishmaniose visceral. Cerca de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão, onde 10% evoluem para óbito (WERNECK, 2016).

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2015

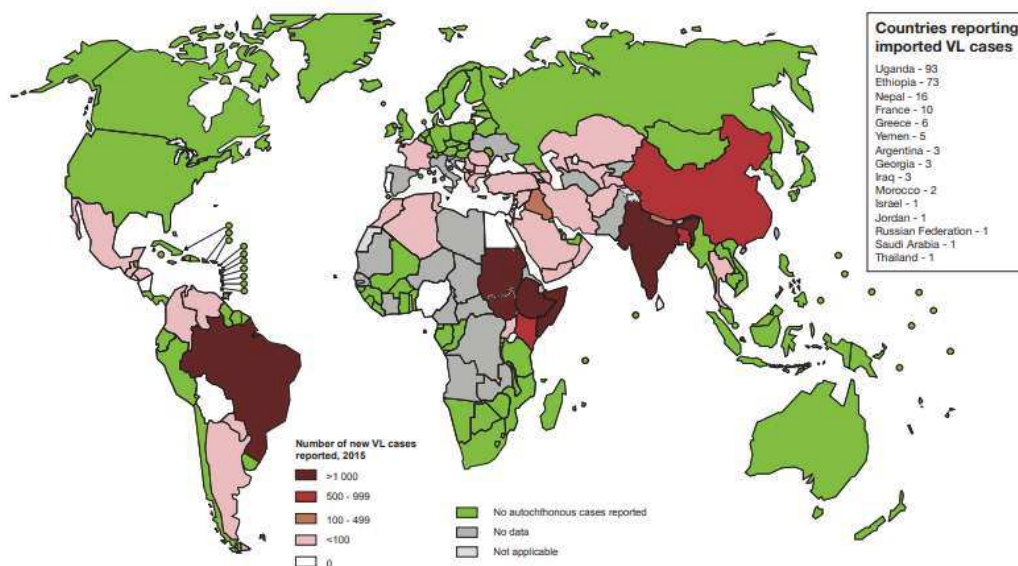


Figura 1. Distribuição mundial da leishmaniose visceral, 2015.

Fonte: Organização Mundial da Saúde (WHO)

A LV é uma doença potencialmente fatal, se não tratada, sendo considerada endêmica em 12 países das Américas. Nesse contexto, o Brasil ocupa um papel de

destaque, visto que representa cerca de 96% dos casos dessa região, tendo casos reportados também na Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela (Figura 2) (OPAS; OMS, 2018).

A incidência de Leishmaniose cutânea (LC) e mucocutânea (LMC) correspondem a aproximadamente 1 milhão de novos casos anualmente. Dos 1,3 milhões de casos estimados mundialmente, apenas cerca de 600.000 são realmente notificados. Além disso, a notificação obrigatória da doença se dá apenas em 33 dos 98 países afetados, fato este, que torna desconhecido a real situação das leishmanioses no mundo (WHO, 2013).

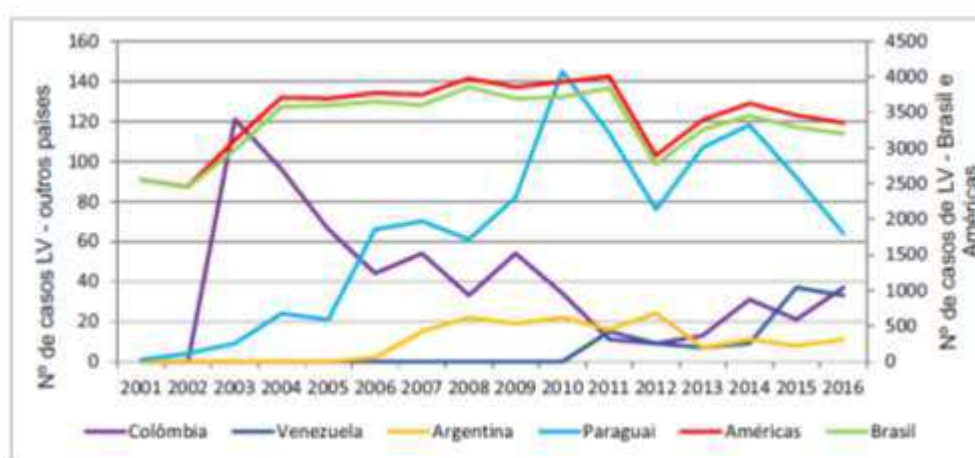


Figura 2. Casos de leishmaniose visceral nos países com maior número de casos nas Américas, 2001-2016.

Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância. Acesso em: 05/09/2018.

No Brasil, a leishmaniose encontra-se amplamente distribuída, já tendo sido descrita em todas as regiões do país. A região Nordeste concentra os maiores casos da doença, seguidos das regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e, mais recentemente, tem-se registrados surtos endêmicos também na região Sul (Figura 3) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

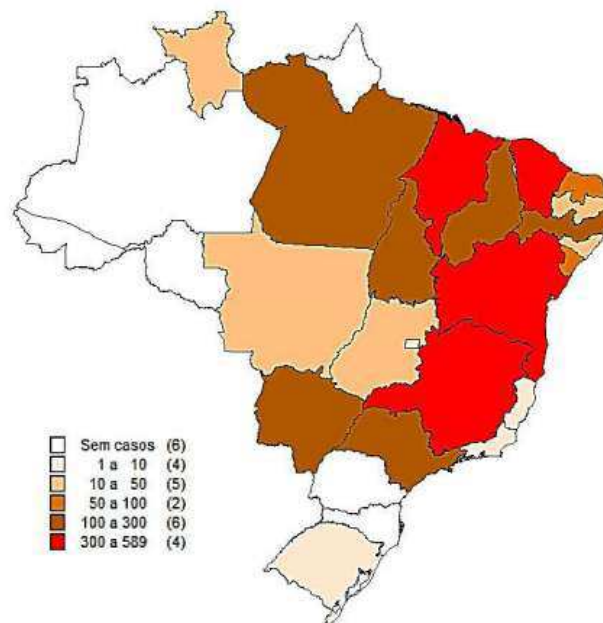


Figura 3. Distribuição de casos da leishmaniose visceral no Brasil, 2015.
Fonte: SVS/MS (2015).

Inicialmente, a leishmaniose visceral era restrita às áreas rurais e periurbanas, no entanto, atualmente, observam-se alterações importantes no cenário de transmissão da doença em decorrência do êxodo rural e desmatamento, onde a doença avançou para outras regiões que antes eram consideradas livres da enfermidade, alcançando grandes centros urbanos. A LV está distribuída em 21 das 27 unidades da Federação, com a prevalência dessas regiões sendo influenciada por fatores geográficos, climáticos e sociais (GONTIJO e MELO, 2004; LAZARI, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Segundo o Ministério da Saúde, o Estado de Maranhão, desde 2015 é considerado o Estado Brasileiro com maior número de casos de leishmaniose visceral em humanos. Em 2015, foram registrados 505 casos. Em 2016, esse número ampliou para 640. Já em 2017, foram reportados 392 casos da doença. Em relação à disseminação da doença entre os municípios, São Luís concentra os maiores índices da enfermidade no Estado, onde em 2017, foram relatados 275 casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

O crescente número de casos de leishmaniose visceral em humanos e cães no Maranhão se dá devido a condições geográficas e climáticas que favorecem biologicamente os criadouros de flebotomíneos, bem como condições sanitárias precárias, ausência de medidas de controle e prevenção, entre outros fatores.

Atualmente, não se tem dados precisos a nível mundial e nacional referente à leishmaniose visceral canina, visto que a notificação de casos não se dá de forma efetiva, mascarando assim, a real situação da enfermidade no Brasil e no Mundo.

2.3 Etiologia

As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas causadas por diferentes espécies de protozoários pertencentes ao Reino Protista (HAECKEL, 1866), Classe Kinetoplastea (HONIGBERG, 1963), Subclasse Metakinetoplastina (VICKERMAN, 1976), Ordem Trypanosomatida (KENT, 1880), Família Trypanosomatidae (DOFLEIN, 1901), Subfamília Leishmaniinae (MASLOV & LUKES, 2012) e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) (AKHOUNDI et al., 2016).

Até o momento, tem-se conhecimento a respeito de 30 espécies distintas de *Leishmania*, onde aproximadamente 20 destas, são consideradas patogênicas ao homem e a outros hospedeiros mamíferos, causando as formas visceral, cutânea ou mucocutânea (GRAMICCIA & GRADONI, 2005; WHA et al., 2017; KAUFER et al., 2017).

No que diz respeito à leishmaniose visceral, a espécie envolvida depende da região em que ela está inserida, sendo a *Leishmania donovani* o agente etiológico em países do Velho Mundo. No Brasil, o agente etiológico da LV é a *Leishmania infantum* (CHAPPUIS et al., 2007; KATRIN KUHL et al., 2011).

Os protozoários causadores das leishmanioses são considerados parasitas intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear. O parasito apresenta-se sob duas formas evolutivas principais: promastigota e amastigota (SLAPPENDEL, 1988).

A forma promastigota pode ser encontrada no trato digestivo dos insetos vetores (hospedeiro invertebrado) ou em cultura de células, medindo de 5-15 µm, com forma alongada e flagelo livre, sendo adaptadas em temperatura entre 22 e 26 °C (HARHAY, 2011). O núcleo é central, formado de feixes paralelos de microtúbulos, envoltos em uma bainha citoplasmática (FERREIRA et al., 2003; BASANO e CAMARGO, 2004; AHID, 2009).

A forma amastigota está presente nos tecidos dos vertebrados, especialmente em macrófagos, apresentando uma forma arredondada ou ovóide, com

flagelo internalizado, medindo de 3-5 μm de diâmetro com núcleo central e cinetoplasto contendo DNA extranuclear. Essas formas são adaptadas à temperatura corporal de mamíferos. (HARHAY et al., 2011).

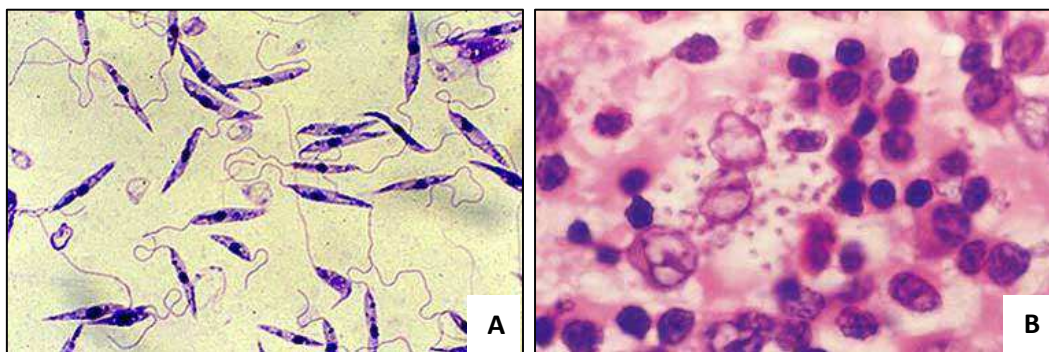


Figura 4. Formas evolutivas de *Leishmania* spp. A: Promastigotas. B: Amastigotas.
Fonte: Ministério da Saúde do Brasil, 2015.

Atualmente, cerca de 70 espécies de animais atuam como reservatórios de espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem (ROSE et al., 2004). O cão doméstico é considerado o principal reservatório epidemiológico da *Leishmania infantum* (MELO, 2004; BEST et al., 2014).

No ambiente silvestre, raposas e marsupiais representam uma importante fonte de infecção. Todavia, diversos grupos de animais também já foram incriminados como reservatórios da leishmaniose visceral, tais como: tamanduás, tatus, canídeos, primatas e preguiças, bem como equinos e o homem (LUPPI et al., 2008; DOUGALL et al., 2009). Atualmente, os felinos também têm sido reportados como possíveis reservatórios do agente, tendo importante papel na manutenção desta enfermidade (ZORZETTO, 2008; METZDORF et al., 2017).

2.4 Transmissão

A transmissão e continuidade do ciclo de vida dos protozoários inseridos no gênero *Leishmania* ocorre por meio de mecanismos de interação entre parasito, vetor, hospedeiro vertebrado e o ambiente (DANTAS TORRES et al., 2012).

Os flebotomos são os vetores responsáveis pela transmissão do parasito ao hospedeiro vertebrado. São insetos hematófagos pertencentes à família Psychodidae, e aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), e apresentam

uma vasta distribuição nas regiões de clima temperado e quente. São popularmente conhecidos como mosquito palha, birigui ou tatuquira (MONTEIRO et al., 2005; VICENTE SOBRINHO, 2010).

Esses insetos apresentam pequeno porte, medindo em torno de 1 a 3 mm de comprimento, patas longas e delgadas e corpo coberto de cerdas; sendo caracterizados por voarem em pequenos saltos e pousarem com as asas entreabertas (Figura 5) (FEITOSA, 2002; PRATA & SILVA, 2005).

As fêmeas, por serem hematófagas obrigatórias, apresentam uma importância epidemiológica maior no ciclo da doença. Esses insetos possuem hábitos crepusculares e noturnos, adaptando-se facilmente a ambientes peridomiciliares e domiciliares; bem como a temperaturas variadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Até o presente momento, são conhecidas aproximadamente 30 espécies de flebotomíneos causadores da leishmaniose visceral humana e canina nas Américas (ARIAS et al., 1996). No entanto, no Brasil, a principal espécie de vetor relacionada à transmissão da doença é *Lutzomyia longipalpis* e, mais recentemente, a espécie *Lutzomyia cruzi* foi incriminada como transmissora da *L. infantum* no Estado do Mato Grosso do Sul (MISSAWA et al., 2011).



Figura 5. Fêmea de Flebotomíneo adulto, engurgitada.
Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2017.

Outras formas de transmissão da LV já foram descritas, tais como: transmissão venérea, transplacentária e transfusão sanguínea (NAUCKE; LORENTZ, 2012; MARCONDES; ROSSI, 2013). Sabe-se que o *Rhipicephalus sanguineus*, popularmente conhecido como carrapato marrom do cão, pode albergar o parasito, entretanto, não se tem evidências comprobatórias sobre a importância epidemiológica

destes mecanismos na transmissão e manutenção dessa zoonose (DANTAS- TORRES et al., 2011; NAUCKE; LORENTZ, 2012; MARCONDES; ROSSI, 2013).

2.5 Ciclo Biológico e Patogenia

Em relação ao parasito, este possui um ciclo biológico heteroxeno, ou seja, necessita obrigatoriamente de dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida, sendo um vertebrado e um invertebrado (KONTOS; KOUTINAS, 1993).

A infecção no vetor ocorre durante o repasto sanguíneo, onde flebotomíneos fêmeas sugam o sangue do mamífero infectado. Nesse momento, há a ingestão de amastigotas de *Leishmania* livres presentes nos tecidos ou em fagolisossomos dos macrófagos ou outras células fagocíticas (HANDMAN; BULLEN, 2002). No trato digestivo dos vetores, ocorre a diferenciação das formas amastigotas em promastigotas procíclicas, as quais se multiplicam por divisão binária. Posteriormente, os parasitos passam por sucessivos estágios (nectomonada, leptomonadas e haptomonadas), até alcançarem a região torácica do intestino do vetor. As formas leptomonadas secretam quitinases e um gel denominado PSG (*promastigote secreted gel*), que promovem a destruição da válvula estomodeal do vetor, dificultando assim, o processo de sucção do sangue. Estas por sua vez, irão colonizar o esôfago e a faringe do flebotomíneo, onde permanecem aderidas ao epitélio por meio do flagelo, e em seguida, se diferenciam em formas infectantes, promastigotas metacíclicas (BATES, 2007). O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Após esse período, durante um novo repasto sanguíneo, o flebotomíneo acaba regurgitando o sangue recém-ingerido, o qual contém as formas infectantes, ocasionando a transmissão do parasito ao hospedeiro vertebrado (ROGERS; BATES, 2002).

Na epiderme do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas serão internalizadas por macrófagos e outras células do sistema mononuclear fagocitário (SFM) e, uma vez no interior delas, as condições de pH do meio ácido, aumento da temperatura e a disponibilidade de íons de ferro (Fe⁺), acarretam na diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, multiplicando-se rapidamente até o rompimento das mesmas e liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos, ocorrendo então a disseminação hematogênica para tecidos ricos em células do SFM,

tais como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Figura 6) (SILVA, 2007; SARIDOMICHELAKIS, 2009; PODINOVSKAIA et al., 2015).

Na tentativa do organismo do hospedeiro vertebrado de conter o processo instalado, os órgãos afetados sofrem uma hiperplasia progressiva. A progressão da doença é facilitada devido a não destruição do agente fagocitado pelas células do SMF (principalmente macrófagos). O período de incubação da doença é variável de acordo com a espécie envolvida. No homem, varia em média de 10 dias a 24 meses. Nos cães, esse período pode ser de 3 meses até anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

2.6 Imunopatogenia da LVC

Durante a infecção por *Leishmania*, o hospedeiro responde a diversos estímulos através de mecanismos da imunidade inata e adaptativa, bem como, da resposta imune celular e humoral (REIS et al., 2010). A *Leishmania* spp. apresenta uma ampla variedade antigênica, permitindo a sua interação com as células do hospedeiro na produção de sinais desencadeadores da liberação de mediadores e ativação de células da resposta imunitária inata e adaptativa (MARTINEZ et al., 2009).

Após a inoculação do parasito no hospedeiro vertebrado, a pele atua como a barreira inicial, exercendo uma função crucial na imunopatogênese da doença (PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015). Em seguida, são ativados fatores do sistema complemento no intuito de debelar os parasitos presentes, no entanto, os que sobrevivem, são internalizados nas células residentes do sistema fagocítico, tais como células de Langerhans, células dendríticas, neutrófilos e macrófagos, principalmente (NORONHA et al., 1998).

Posteriormente, ocorre o recrutamento de macrófagos e mastócitos, que também exercem funções primordiais na resposta imune inata e na resistência contra a infecção de *L. infantum* na derme. Os macrófagos são apontados como as células hospedeiras mais importantes no estabelecimento da infecção e permanência do parasito (PEARSON; SOUSA, 1996). Em seguida, ocorre a migração progressiva dos leucócitos da pele para outras regiões do organismo animal (SANTOS- GOMES et al., 2000).

O curso da leishmaniose visceral canina está relacionado à resposta imunológica do hospedeiro, a espécie de *Leishmania* envolvida, além da persistência e proliferação dos parasitas em toda a pele e órgãos viscerais. Cada espécie distinta de

Leishmania sp. direcionará a infecção diferentemente, pois é dependente da modulação da atividade fagocítica de macrófagos, resultante de interações entre distintos receptores, tais como receptores do sistema complemento (CR), receptores de manose, receptores de fibronectina e receptores Fc γ (UENO; WILSON, 2012).

Os macrófagos, além de possuírem atividade fagocítica e microbicida, também atuam como células apresentadoras de antígeno (APCs) orientando-se até o os nódulos linfáticos para ativar linfócitos T, que por sua vez iniciam um processo de proliferação e diferenciação em linfócitos T efetores (SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Além disso, estas células apresentam mecanismos leishmanicidas, como a respiração oxidativa que leva a produção de óxido nítrico (NO), a partir do precursor L-arginina, pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), sendo esta, uma das mais importantes moléculas responsáveis pela morte do parasita (BOGDAN, 2001).

O controle da infecção por *Leishmania* está associado à destruição das amastigotas intracelulares pelos macrófagos, através da ativação das células NK e linfócitos T (SANTOS-GOMES et al., 2008; MENEZES-SOUZA, 2009).

Apesar dos macrófagos serem células especializadas na fagocitose e destruição de agentes patogênicos, o parasito possui um conjunto de estratégias que permitem alterar mecanismos de produção de citocinas importantes para resposta protetora do hospedeiro (ROSA, 2012).

Durante a infecção por parasitos intracelulares, tal qual a *Leishmania*, células infectadas liberam IL-12, que ativam o processo de diferenciação de linfócitos T helper (Th), compreendendo em duas subpopulações (T CD4+ e T CD8+), podendo se diferenciar e produzir padrões distintos de citocinas (KORN et al., 2009).

A produção de citocinas ocorre em resposta a diferentes antígenos, podendo estimular respostas celulares distintas envolvidas na imunidade e no processo de inflamação. Estas influenciam na síntese e ação de outras citocinas, promovendo deste modo, uma cascata, onde citocinas produzidas posteriormente podem mediar os efeitos biológicos das iniciais. As respostas às citocinas consistem em mudanças na expressão genética nas células alvo, o que resulta em novas funções e algumas vezes, na proliferação de células-alvo (HADMAN e BULLEN, 2002; MENEZES-SOUZA, 2009).

A resposta imunológica em cães infectados por *Leishmania* ocorre devido à interação complexa entre a imunidade celular e humoral (REIS et al., 2010). Cães positivos podem apresentar diferentes perfis imunológicos, podendo estar relacionada à resistência, sendo caracterizada por altas proporções de linfócitos T CD4⁺ e células B CD21⁺, com consequente aumento na expressão de IFN- γ (COURA-VITAL et al., 2011; MENEZES-SOUZA et al., 2011).

Na LVC, a resposta imune mediada pelos linfócitos Th1 estimula a resposta imune celular ativando os fagócitos, células NK e linfócitos T citotóxicos na tentativa de debelar o parasito. A elevada expressão de IFN- γ , IL-12, IL-2 e TNF- α estimulam a resposta inflamatória, as quais induzem a ativação dos macrófagos para posterior redução do crescimento de amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp., desencadeando uma resposta imune protetora, controlando a infecção (BARBIERI, 2006; ALVES et al., 2009).

O papel da IL-12 é crucial no controle da infecção, uma vez que induz a produção de IFN- γ por parte das células polimorfonucleares e uma maior atividade das células NK, mantendo, deste modo, eficácia na resposta imunitária dos linfócitos Th-1 (FERRER, 2002; BARBIÉRI, 2006).

Além disso, estimulam os linfócitos B a secretarem IgG (BARBIEI, 2006; ALVES, 2009). Em contrapartida, células Th2 induzem a produção de anticorpos IgE, IgA e subclasses de IgG, estimulando a resposta inflamatória mediada por eosinófilos, basófilos e mastócitos (HAILU et al, 2005; YOSHIMOTO et al., 2009).

Em animais infectados assintomáticos prevalece a resposta do tipo Th1, uma vez que IFN- γ e outras citocinas inibem a ação de células Th2, com posterior ativação de linfócitos B e produção de IgG2 (PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2005; BARBIEI, 2006).

Por outro lado, quando a resposta imunológica é mediada por linfócitos Th2, estando relacionada com uma resposta imunitária humoral, há um predomínio de IL-4, que juntamente com IL-10, inibem a ativação de Th1, aumentando IgG1, IgA e IgE (BELKAID et al., 2002). Elevadas expressões de IL-5, IL-13 e TGF- β também são observadas, inibindo a ativação de macrófagos e a linfoproliferação, promovendo consequentemente a proliferação de linfócitos B e estimulando a produção de anticorpos que estão associados à susceptibilidade à infecção e manifestações clínicas graves

(BELKAID & TARBELL, 2009; MENEZES-SOUZA et al., 2011; SELVAPANDIYAN et al., 2012).

Na LVC, as células Th17 exercem um papel essencial, visto que atuam promovendo a modulação de IL-10 e potencializando a produção de NO e na indução da resposta inflamatória tecidual (NASCIMENTO, 2012; KATARA et al., 2012).

Resposta Humoral frente à LVC

No âmbito da resposta humoral, acreditavam-se que esta não exercia papel imunoprotetor na leishmaniose visceral, em decorrência da elevação dos níveis de anticorpos associados à evolução clínica da doença em humanos e em cães. Inicialmente, as pesquisas relacionadas à resposta imune humoral em cães com LV eram voltadas para realização de enquéritos soro-epidemiológicos e diagnóstico da enfermidade. Em estudo realizado por Abranches et al. (1991) não foi observada correlação entre os títulos de anticorpos e as formas clínicas da doença, no entanto, observou-se uma tendência entre os elevados níveis de anticorpos e o agravamento dos sinais clínicos.

As principais imunoglobulinas expressas durante a infecção por *Leishmania* são: IgG e subtipos IgG1 e IgG2, IgA, IgE e IgM.

A imunoglobulina G (IgG) se apresentam na estrutura de monômeros (imunoglobulina 7S), sendo a principal e mais abundante imunoglobulina encontrada no soro (75%). Além disso, é a principal Ig em espaços extra vasculares. Dentre suas propriedades, é a única classe de Ig que atravessa a barreira transplacentária, onde a transferência é mediada pelo receptor da região Fc do IgG nas células placentárias. Ligam-se a células, como macrófagos, monócitos, PMN's e alguns linfócitos através de receptores de Fc.

As diferentes subclasses de IgG apresentam pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos na região constante das cadeias pesadas. Os principais isotipos de IgG avaliados em cães com leishmaniose visceral são IgG1 e IgG2, empregados para avaliação de prognóstico da doença, bem como evolução clínica dos animais infectados após o tratamento (SOLANO- GALLEGO et al., 2001).

Aumento de níveis séricos de IgG total estão de acordo com a evolução clínica da LVC. Níveis séricos de IgG1 estão correlacionados a cães assintomáticos

infectados por *L.infantum*. Em contrapartida, A presença elevada dos níveis de IgG2 está relacionada a gravidade da doença, sendo mais expressos em cães positivos sintomáticos (REIS et al., 2006).

A imunoglobulina A (IgA) encontrada no do soro é um monômero, no entanto, também pode ser encontrada em secreções, tais como lágrimas, saliva, colostro, muco e na urina de cães infectados por *L.infantum*, onde neste último, pode estar associada à dano renal (TEIXEIRA NETO et al., 2010).

A IgA desempenha um papel essencial na imunidade de mucosas, impedindo a adesão de patógenos à barreira epitelial. Além disso, esta imunoglobulina pode se ligar a algumas células, como PMN'S e alguns lofócitos. Durante a infecção por *Leishmania*, níveis elevados de IgA podem ser observados em cães positivos para LV e sintomáticos (TEIXEIRA NETO et al., 2010).

A produção de anticorpo IgE, geralmente está associada com infecções helmínticas e alergias, mas também tem sido detectada em infecções com microrganismos intracelulares (SOUSA - ATTA et al., 2002)..

A IgE é o isótipo que contém a cadeia pesada ϵ , e de todos os isótipos de Ig, a IgE é o mais eficiente na ligação aos receptores Fc dos mastócitos e na ativação dessas células (ABBAS et al., 2012). A IgE desenvolve sua função biológica após a fixação ao receptor de alta afinidade (Fc ϵ RI) em mastócitos, basófilos e células de Langerhans. Estes anticorpos são produzidos em resposta imune do tipo Th2, estando associada com o agravamento dos sinais clínicos em cães infectados (SOUSA - ATTA et al., 2002).

Níveis elevados na produção de IgE desencadeia a ativação de células, como mastócitos, com consequente liberação de histamina e mediadores inflamatórios, resultando na amplificação do processo inflamatório e o aparecimento de alterações teciduais características (LAGE et al., 2007; MENEZES-SOUZA et al., 2011).

Durante a infecção por *Leishmania*, níveis séricos de IgE em cães está relacionado ao agravamento dos sinais clínicos, sendo mais observados em cães positivos sintomáticos (REIS et al., 2006).

A imunoglobulina M (IgM) normalmente se apresenta como um pentâmero (imunoglobulina 19S), no entanto, pode apresentar-se estruturalmente também como monômero. Em decorrência de sua estrutura, a IgM é boa fixadora de complemento, sendo eficientes na lise de microorganismos (CAMPILLO et al., 1999).

Uma resposta humoral exacerbada favorece mecanismos imunopatogênicos, em decorrência do aumento na produção de anticorpos, como consequência da estimulação policlonal de linfócitos B, induzindo a formação de imunocomplexos. O depósito destes complexos imunes circulantes sobre o endotélio vascular promove uma reação de hipersensibilidade do tipo III, que são removidos de forma eficiente pelo sistema monocítico-macrofágico (CAMPILLO et al., 1999). Entretanto, o acúmulo excessivo destes complexos, impossibilita a sua remoção de forma eficaz (CAMACHO & LUCENA, 2008).

Os complexos imunes circulantes ativam o complemento, que por sua vez induz a desgranulação de basófilos e plaquetas, e conseqüentemente, a liberação de histamina e de outros mediadores inflamatórios. Estes mediadores aumentam a permeabilidade vascular, os quais se depositam em vários órgãos e tecidos como os rins, vasos sanguíneos e articulações, provocando danos relevantes ao hospedeiro e favorecendo o aparecimento dos sinais clínicos (CARDOSO et al., 2007; REIS et al., 2010).

2.7 Sinais clínicos

As variadas modalidades epidemiológicas dessa parasitose são o reflexo da multiplicidade de espécies do parasito, de insetos vetores e reservatórios, convivendo em diferentes ambientes (CAMPOS-PONCE et al., 2005).

Os mecanismos de interação entre parasito e hospedeiro direcionam a gravidade do quadro clínico expressado pelos animais acometidos por essa enfermidade. A espécie e os fatores de virulência do parasito, bem como os fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro vertebrado, tais como a carga parasitária, resposta imunológica, estado nutricional, idade e genética são fatores determinantes na expressão dos sinais clínicos da enfermidade no organismo animal (DANTAS-TORRES, 2006).

Após a infecção, cães que apresentam sinais clínicos e/ou alterações patológicas são classificados como sintomáticos. Em contrapartida, animais que não apresentam qualquer alteração clínica são designados assintomáticos. De acordo com a evolução da doença e agravamento de sinais clínicos, a infecção pode ser letal em um curto período de tempo (SOLANO et al., 2011).

Do ponto de vista epidemiológico, deve-se ter uma atenção especial para os animais considerados assintomáticos, visto que estes podem atuar como fonte de infecção silenciosa, contribuindo assim, para a manutenção do ciclo zoonótico de transmissão da LVC (SANTOS et al., 2010).

Os sinais clínicos comumente observados em cães infectados por *Leishmania infantum* são: febre, perda de peso, anemia, lesões de pele com alopecia multifocal, úlceras cutâneas em região de ponta de orelha, focinho e região periorbital, linfadenopatia, onicogribose, conjuntivite, blefarite, uveíte, esplenomegalia, hepatomegalia (LINHARES et al., 2005; SILVA, 2007). Quadros de dificuldade locomotora, polidipsia, êmese, diarreia, polifagia, epistaxe e melena também podem estar presentes (FEITOSA, 2000).

Em decorrência da queda na imunidade animal, doenças oportunistas poderão ser observadas, como cistite, pneumonia, piodermites, malassesíase, dermatofitoses e demodicose (FEITOSA, 2000; GALVEZ et al., 2011).

Durante a infecção por *L. infantum* pode-se destacar alguns achados laboratoriais significativos, como anemia, em decorrência de hemorragia, falha renal, aplasia medular, dentre outras (REIS et al., 2006, DANESHVAR et al., 2009); leucocitose e neutropenia (FREITAS et al., 2011), leucopenia com eosinopenia, linfopenia e monocitopenia também podem estar presentes (REIS et al., 2006; PALUDO et al., 2007). Níveis elevados de ureia, decorrentes de falha renal; e quadros de hiperproteinemia e hiperglobulinemia associados ao aumento da produção de anticorpos são frequentemente observados (ABREU-SILVA et al., 2008; CIARAMELLA e CORONA, 2003).

Em achados histopatológicos de fígado de cães naturalmente infectados, sintomáticos e assintomáticos, geralmente observa-se uma reação inflamatória crônica caracterizada por infiltrado de células mononucleares, localizados no espaço porta e parênquima hepático. Em cães assintomáticos também tem sido relatado presença de granulomas hepáticos, o que promove uma diminuição de parasitos no fígado desses animais (MELO et al., 2009).

2.8 Diagnóstico

Devido à gravidade da leishmaniose visceral canina, refletindo em um alto índice de morbidade e mortalidade da doença, se não for tratada, o diagnóstico preciso e precoce se faz extremamente necessário. No entanto, em virtude da variedade de sinais clínicos apresentados pelos animais e uma alta incidência de cães assintomáticos em regiões endêmicas, o diagnóstico precoce da LVC se torna prejudicado, o que influencia diretamente em falhas no manejo clínico desses animais e no controle dessa enfermidade (MADEIRA et al., 2004; CARDOSO et al., 2004).

Análises epidemiológicas juntamente com o exame clínico minucioso promovem o direcionamento para se estabelecer uma suspeita clínica e, posterior escolha dos métodos de diagnósticos e exames a serem empregados (MARTÍNEZ-MORENO et al., 1999).

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina pode ser realizado por meio de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. O diagnóstico parasitológico é baseado na visualização do parasito obtido através de materiais biológicos de punção do baço, fígado, linfonodos e medula óssea (MO) (GENARO et al., 1988). Algumas desvantagens deste método são danos que eventualmente possam ser causados, caso não seja executado de forma correta; e a dificuldade na observação de parasitos quando o animal apresenta uma baixa carga parasitária, podendo refletir em um resultado falso negativo (ASHFORD, 1995).

Os testes moleculares são caracterizados pela detecção do DNA do parasito, como a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), se destacando por apresentar alta especificidade e sensibilidade, contudo, esta técnica se limita, uma vez que possui elevado custo de execução (GHARBI et al., 2015).

Na rotina clínica, os métodos sorológicos são amplamente empregados para triagem e para inquéritos em saúde pública, em razão de serem pouco invasivos e relativamente baratos. Esses métodos visam à detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, visto que a doença promove uma estimulação policlonal de linfócitos B, resultando em uma grande produção de anticorpos, tais como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), fixação de complemento, aglutinação direta e teste imunocromatográfico rápido (TR DPP®). As técnicas sorológicas ELISA e teste imunocromatográfico (TR DPP®) são recomendadas pelo Ministério da Saúde para

avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários, sendo o primeiro um teste de triagem e o segundo confirmatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A sensibilidade, especificidade e o custo desses testes são um problema na prática da clínica, dado que não se tem um teste 100% sensível e específico, tornando o diagnóstico da leishmaniose visceral canina no Brasil desafiador (QUEIROZ et al., 2004; QUINNELL et al., 2018).

2.9 Tratamento

Tratamento em Humanos

O tratamento da leishmaniose visceral em humanos, no Brasil, consiste na utilização de drogas como antimonial pentavalente, existente sob a forma de antimoniato de N-metilglucamina; em menor escala, utiliza-se também a anfotericina B que possui uma ação leishmanicida e é geralmente utilizada quando o tratamento com o antimonial não apresenta respostas satisfatórias (MANUAL ZOONOSES, 2009).

Em Humanos, os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados como fármacos de eleição no tratamento da leishmaniose (GREENE, 2006). O seu mecanismo de ação atua na inibição das enzimas protozoárias responsáveis pela glicólise e oxidação de ácidos gordos, bloqueando, assim, o seu metabolismo (BANETH, 2002). O antimoniato de N-metilglucamina por não apresentar boa absorção por via oral, sendo, portanto, utilizado diariamente por via intramuscular (IM), subcutânea (SC) ou endovenosa (EV), podendo desenvolver nos humanos e animais efeitos adversos como claudicações, inflamações locais e tromboflebites (NOLI, 1999; GREENE, 2006).

O protocolo terapêutico mais empregado consiste na utilização da droga diariamente na dose de 75 a 100mg/kg, a cada 24 horas (SID) ou 40 a 75mg/kg a cada 12 horas (BID), via subcutânea, durante 3 a 4 semanas (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Em torno de 80% do fármaco é excretado pela urina, devendo ser utilizado com cautela em pacientes cardiopatas, nefropatas e hepatopatas (GREENE, 2006).

A Anfotericina B é outro fármaco empregado no tratamento da leishmaniose visceral, sendo um antifúngico que apresenta uma boa eficácia contra alguns

protozoários. No entanto, sua utilização é limitada, visto que seu uso apresenta desvantagens como alta nefrotoxicidade (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

A utilização de fármacos de uso humano para tratamento de leishmaniose visceral canina vem sendo discutida e têm-se uma preocupação quanto à utilização destes, visto que são de alto custo; e quando utilizados em longo prazo, podem causar danos importantes à saúde desses animais, bem como podem causar resistências nos parasitos, dificultando assim o tratamento tanto em cães como em seres humanos (BANETH, 2002; VULPIANI et al., 2011).

Tratamento da leishmaniose visceral canina

No Brasil, até meados de 2016, o tratamento de cães infectados por *Leishmania* sp. era terminantemente proibido, visto que não havia nenhuma droga que não fosse de uso humano, bem como a ausência de drogas autorizadas pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para essa finalidade. No entanto, em 2016, o MAPA, por meio da nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS, autorizou a comercialização da Miltefosina (Milteforan®) para tratamento de cães positivos, onde estes devem ser reavaliados periodicamente, para que se tenha um acompanhamento da evolução ou progressão clínica desses animais (MAPA, 2017).

O tratamento da LVC ainda enfrenta divergências, levando em consideração que o mesmo não anula a carga parasitária de animais infectados, mesmo que haja uma melhora nos sinais clínicos apresentados por estes, ou seja, o animal permanece como fonte de infecção, contribuindo diretamente com a manutenção do ciclo da doença (WHO, 2008).

O tratamento de animais não é direcionado para a cura parasitológica, visando, portanto, somente a cura clínica, a melhora da resposta imunológica, a redução da carga parasitária e, conseqüentemente, a redução da capacidade de transmissão do parasito (NOLI, 2014).

A miltefosina (Milteforan®) é um aquilfosfolípídeo (hexadecilfosfocolina), no Brasil, foi inserida como uma alternativa terapêutica no tratamento de cães infectados por *Leishmania* sp., no entanto, essa droga foi desenvolvida originalmente para uso de terapia anti-neoplásica (UNGER et al., 1989). O mecanismo de ação da

miltefosina promove a disfunção de sinalização de vias e na síntese de membrana celular (MIRÓ et al., 2017).

A miltefosina é capaz de penetrar na membrana celular, causando um rápido e intenso metabolismo dos ésteres fosfolipídeos nas espécies de *Leishmania*. Além disso, interfere nas etapas da comunicação celular e no processo de síntese das membranas celulares do parasito inibindo a biossíntese de receptores GPI (glicosil fosfadil-inositol), sendo esta uma molécula essencial para a sobrevivência intracelular das formas amastigotas da *Leishmania*; bem como interrompendo o sinal de transdução da membrana por ativação da fosfolipase C *Leishmania* específica e da proteinoquinase C (CROFT et al., 2006).

No meio intracelular, o acúmulo da miltefosina é regulada por transportadores ATPase do tipo P, provocando processos similares ao de apoptose em formas amastigotas de *Leishmania* sp., além disso, atua também sobre a estimulação de óxido nítrico sintase 2, a qual catalisa a produção de NO contribuindo com a resposta celular contra o parasito (WADHONE et al., 2018).

O protocolo terapêutico preconizado consiste na utilização da droga, por via oral, na dose de 2 mg/kg/SID, durante 28 dias (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). A facilidade de administração e a baixa toxicidade são algumas vantagens deste fármaco, entretanto, alguns efeitos gastrointestinais podem ser observados, vômitos e diarreia (VULPIANI et al., 2011). Além disso, apresenta um potencial efeito teratogênico, sendo limitada sua utilização em cadelas gestantes (DORLO et al., 2012).

Em estudos realizados com cães naturalmente infetados no Brasil, observou-se uma melhora clínica em 50% (7/14) dos animais tratados com a miltefosina. Estudos desenvolvidos na Europa obtiveram resultados similares, com melhora clínica dos animais assintomáticos. No entanto, os autores ressaltam a necessidade de acompanhamento clínico durante o tratamento em razão do efeito hepatotóxico e nefrotóxico da droga (WOERLY et al., 2009). O principal efeito adverso observado no uso de miltefosina tanto em cães quanto em humanos foi êmese (ANDRADE et al., 2011).

A utilização de drogas como alopurinol juntamente com a miltefosina tem se mostrado eficaz, com melhoras no quadro clínico e até mesmo redução da carga parasitária na medula óssea e baço. Todavia, o prognóstico varia de acordo com o

estado clínico do animal e a resposta imunológica do mesmo frente ao tratamento (DANTAS-TORRES et al., 2012).

Um grande desafio enfrentado quanto ao tratamento de cães com leishmaniose visceral é o aparecimento de recidivas em torno de 6 meses a 2 anos após o término do tratamento, bem como a possibilidade de resistência medicamentosa. Os mecanismos de resistência ainda não estão bem esclarecidos na literatura, embora sugira-se que exista uma diminuição da absorção da droga devido à diferença de permeabilidade plasmática a qual contribui para o aumento do efluxo da droga realizado por transportadores específicos MDR-1. O alto custo desse fármaco também dificulta o tratamento desses animais, apesar da facilidade na administração da droga (REGUERA et al., 2016).

2.10 Controle e profilaxia

Com a disseminação da leishmaniose da zona rural para o meio urbano tem-se uma dificuldade maior por parte dos órgãos de saúde no controle e na aplicação de medidas preventivas contra a infecção (DANTAS-TORRES, 2006).

No Brasil, o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral é formado por medidas baseadas na eliminação de cães soropositivos reservatórios e do vetor, no diagnóstico preciso, no tratamento efetivo da doença e em atividades de educação em saúde (DANTAS-TORRES, 2012).

O controle vetorial é considerado uma das medidas mais importantes nesse processo, porém de difícil execução e monitoramento efetivo. Outro fator limitante é a falta de conhecimentos sobre a ecologia e a biologia dos flebotomíneos em regiões urbanas, o que dificulta a implementação de medidas de controle direcionadas a minimizar a expansão desses vetores (ALMEIDA et al., 2010; WERNECK, 2014).

O uso de coleiras a base de inseticidas (deltametrina 4%) tem sido eficiente na redução do risco de infecção, no entanto, se restringe a grupos específicos devido ao seu alto custo (REITHINGER, 2004).

A utilização de telas em canis individuais ou coletivos também auxilia na redução da exposição desses animais à infecção; assim como o controle da população canina errante; e o tratamento dos mesmos são medidas de controle e prevenção que devem ser adotadas. Medidas permanentes aplicadas ao meio ambiente tem-se mostrado

bastante eficazes, como cuidados de limpeza, retirada de matéria orgânica em excesso e utilização de inseticidas e plantas repelentes de insetos (ex.: citronela), visando a alteração nas condições que favoreçam a proliferação do vetor (CAMARGO-NEVES, 2005). Os programas de controle atuam interrompendo o ciclo de transmissão do agente, de modo a reduzir a incidência da infecção em cães e em humanos (DANTAS-TORRES et al., 2012).

A vacinação atua como medida auxiliar no processo de prevenção da doença, porém, associadas a ela, outras medidas devem estar presentes, pois não há constatação da sua efetividade para o controle da LVC em programas de saúde pública quando utilizada isoladamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A Leish-Tec® é uma vacina recombinante composta pelo antígeno A2, uma proteína específica do estágio amastigota de várias espécies de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*). A vacina induz uma resposta imune celular protetora contra a infecção em cães, devido à capacidade imunoestimulante do antígeno vacinal recombinante A2 (rA2) (COELHO et al., 2003; ZANNIN et al., 2007; FERNANDES et al., 2008).

Um aumento nos níveis da subclasse IgG2 pode ser induzido pela vacinação, tanto em soros pré-ímmunes e nos animais vacinados, tanto após a primeira quanto na terceira dose (MENDES et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o perfil clínico, hematológico, bioquímico e humoral de cães naturalmente infectados, vacinados ou tratados contra a Leishmaniose visceral canina na cidade de São Luís- MA.

3.2 Específicos

- Avaliar o perfil clínico, hematológico e bioquímico resultante da infecção, vacinação ou tratamento contra LVC;
- Quantificar a produção de imunoglobulinas da classe IgG (subclasses IgG1 e IgG2), IgM, IgA e IgE nos diferentes grupos de animais;
- Avaliar os níveis de imunoglobulinas e verificar sua correlação com as formas assintomáticas e sintomáticas da leishmaniose visceral canina.
- Avaliar o prognóstico de evolução da doença após o tratamento com a Miltefosina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A pesquisa foi realizada na cidade de São Luís – MA, a qual ocupa uma área de aproximadamente 834, 78 km², representando assim, 0,2492 por cento do estado do Maranhão. Encontra-se 2° ao Sul do Equador, nas coordenadas geográficas latitude S 2°31, longitude W 44°16, estando a 24 metros acima do nível do mar; e apresentando um clima predominantemente tropical, quente e úmido. A população humana estimada em 2017 foi de 1.091.868 habitantes (IBGE, 2018).



Figura 7. Mapa de localização da Cidade de São Luís, Maranhão, Brasil.

Fonte: <https://www.ibge.gov.br/maranhãosaoluis.htm>

4.2 Animais

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal – CEEA do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, conforme protocolo nº 28/2017.

O experimento foi realizado por meio da coleta de sangue de 40 cães domiciliados, de ambos os sexos (macho e fêmea), com e sem raça definida, com idade entre 6 meses e 3 anos, oriundos de atendimentos realizados em clínicas veterinárias particulares, no Hospital Veterinário “Francisco Edilberto Uchôa Lopes” - UEMA, bem como em ambientes domiciliares na cidade de São Luís, Maranhão.

Inicialmente foi feita uma avaliação prévia desses animais, por meio de anamnese e avaliação clínica minuciosa. Além disso, foram obtidos dados referentes aos

animais, tais como: raça, sexo, idade, tipo de alimentação, bairro em que reside, castração, vacinação, vermifugação, entre outros.

Foram coletadas amostras sanguíneas de todos os animais (40 cães), bem como realizado punção medular e/ou linfonodos. No mais, outros exames foram realizados para se excluir a possibilidade de infecção por outros patógenos, tais como, erliquiose, babesiose e anaplasmoses. Foram certificados ainda de que todos os animais estivessem com a carteira de vacinação atualizada, assim como a vermifugação regular; e que não tivessem sido submetidos recentemente a nenhum procedimento cirúrgico ou outros procedimentos que pudessem alterar a resposta imunológica desses animais.

Todos os 40 cães do presente estudo foram avaliados através do histórico, anamnese e exames clínicos realizados. Posteriormente, foi realizada a coleta dos materiais para confirmação e exclusão do diagnóstico de leishmaniose visceral (teste imunocromatográfico rápido DPP®; punção medular e/ou linfonodo; RIFI e ELISA indireto).

De posse dos resultados, e associado à avaliação clínica realizada, os 40 cães foram divididos em 4 grupos distintos, sendo 10 cães positivos sintomáticos para LV (GS), 10 cães positivos e assintomáticos (GA), 10 cães positivos e tratados com Miltefosina (GT) e 10 cães vacinados contra LV (GV) sabidamente negativos para a leishmaniose visceral canina.

Além disso, a avaliação de parâmetros hematológicos, bioquímicos e perfil de imunoglobulinas também foram realizados em todos os animais (GS, GA, GT e GV).

4.2.1 Avaliação dos animais do grupo tratado com Miltefosina

Após diagnóstico, os 10 cães positivos e sintomáticos foram igualmente submetidos à avaliação clínica, hematológica, bioquímica e imunológica.

Foi realizada uma coleta de amostra sanguínea antes do início do tratamento (M0) e outra coleta 1 (um) mês após o término do tratamento (M1) para comparação nos valores hematológicos, bioquímicos e no perfil de imunoglobulinas apresentados por estes animais, antes e após o tratamento ao qual foram submetidos.

O tratamento foi realizado conforme indicação do fabricante, através da utilização da droga na dose de 2mg/kg (equivalente a 1 mL/10kg), uma vez ao dia, por via oral, durante 28 dias.

4.2.2 Avaliação dos animais do grupo vacinado com Leish-tec®

Antes da vacinação, os animais pertencentes a esse grupo foram avaliados clinicamente e submetidos ao teste imunocromatográfico rápido DPP® e ELISA indireto; bem como hematológica, bioquímica e imunológica. Após exclusão e diagnóstico negativo da LVC, iniciou-se o protocolo de vacinação.

A imunização consistiu na aplicação de 3 doses da vacina Leish-Tec® com intervalo de 21 dias cada, por via subcutânea. Nesse grupo de animais, também foram realizadas coletas em 2 momentos distintos: Antes da administração da 1ª dose da vacina (M0) e a segunda 1 mês após a aplicação da última dose (M1), para a avaliação da resposta imunológica desses animais mediante a imunização.

O tratamento e a imunização dos cães foram custeados pelos seus tutores. No entanto, todos os animais foram rigorosamente acompanhados e avaliados durante todo o estudo pelos Médicos Veterinários envolvidos nesse projeto.

4.3 Colheita e preparação de material para análise

4.3.1 Colheita de sangue total

A colheita de sangue foi realizada após devida contenção do animal com auxílio de focinheiras ou mordanças. Posteriormente, foi feita tricotomia e assepsia local com álcool iodado. A colheita de sangue foi realizada através da venopunção da cefálica ou jugular com agulhas de calibre 25 x 0,7 mm, acopladas a seringas estéreis para obtenção de 1,5 mL de sangue. O sangue foi acondicionado em tubos estéreis com anticoagulante e, posteriormente, encaminhados ao Laboratório de Patologia Clínica do Prédio de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, para avaliação das séries vermelhas e brancas.

4.3.2 Colheita e processamento de soro sanguíneo

Foram coletadas três amostras de sangue de cada animal (4,5mL), através da venopunção da veia cefálica ou jugular, utilizando três tubos estéreis sem anticoagulante, onde uma foi encaminhada ao Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estadual do Maranhão, para determinação das concentrações séricas de

ureia, creatinina, proteína sérica total, albumina e as atividades séricas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina; a segunda foi enviada ao Laboratório Veterinário Cernitas para diagnóstico sorológico (RIFI) e, por fim, a terceira amostra sanguínea foi encaminhada ao Laboratório de Imunodiagnóstico da Universidade Estadual do Maranhão, onde foi centrifugada a 1623 g, durante 5 minutos para melhor separação dos soros.

Depois de separados, os soros foram retirados dos tubos por meio de ponteiros estéreis e transferidos para “eppendorfs” e congelados em temperatura a -20°C para posterior realização do teste sorológico ELISA indireto, e em seguida, enviados ao Laboratório de imunomodulação e protozoologia da FIOCRUZ/RJ para a realização da dosagem de imunoglobulinas.

4.4 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral

4.4.1 Exame Parasitológico

O exame parasitológico foi realizado por meio do esfregaço por extensão para visualização das formas amastigotas de *Leishmania*.

Antes punção, foi realizada a contenção dos animais com auxílio de mordanças ou focinheiras, adequada assepsia foi feita na região a ser puncionada (osso esterno). O esfregaço por extensão foi realizado com uma gota de material puncionado da medula óssea e/ou linfonodos, depositado em lâmina de vidro e o esfregaço obtido por extensão com outra lâmina. Em seguida, corado pelo método panótico rápido, para posterior visualização da forma amastigota do parasito. Para realização da punção medular, os cães foram previamente anestesiados com xilazina (2mg/kg) e ketamina (10mg/kg), por via intramuscular.

4.4.2 Exames sorológicos

4.4.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os soros dos cães em estudo foram encaminhados ao Laboratório Veterinário Cernitas para realização do teste de Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com diluição total, para detecção de anticorpos IgG segundo a técnica descrita por Camargo (1966).

4.4.2.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA indireto)

O teste de ELISA (EIE-LVC/Biomanguinhos) indireto foi realizado com o objetivo de confirmar os animais positivos e negativos no DPP (Biomanguinhos), juntamente com a sintomatologia clínica dos cães, por serem oriundos de uma área endêmica e com um alto índice de transmissão. Identificando os que apresentavam título de anticorpos para *Leishmania (Leishmania) infantum*. Os cães que apresentaram títulos baixos associados à clínica e aos demais índices, foram classificados em animais livres da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* e utilizados no grupo controle. O ponto de corte considerado para o ensaio foi de 0,375 determinado pela média da densidade óptica dos orifícios do controle negativo multiplicado por dois.

As microplacas de polietileno de 96 poços (EIE-LVC/Biomanguinhos) são previamente sensibilizadas com *Leishmania major*. Foram diluídos em tubos, 5µL dos controles e das amostras de soro homogeneizadas, em 500µL do diluente (1:100) disponibilizado no kit. Logo em seguida, na placa sensibilizada foram distribuídos 100µL dos controles e das amostras já diluídas. A placa foi levada à estufa à 37°C por 30 minutos.

Logo após, o conteúdo da placa foi lavado 6x em seguida, com 200µL/orifício, aguardando 30 segundos entre cada lavagem. Foram homogeneizados e distribuídos 100µL da diluição do conjugado em cada poço da placa e incubada novamente a 37°C por 30 min. Lavados novamente em solução PBS para então serem distribuídos 100µL do substrato em todos os orifícios. Deixado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 50µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios para bloquear a reação.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplacas de 96 poços utilizando-se filtro para comprimento de onda de 450nm.

4.5 Dosagem de Imunoglobulinas

Devido o alto custo dos kits comerciais para dosagem de imunoglobulinas e disponibilidade dos recursos, optou-se pela realização do cultivo das formas promastigotas de *Leishmania infantum*, preparação do antígeno, sensibilização das placas de 96 poços, para posterior dosagem das imunoglobulinas.

4.5.1 Preparo de antígeno solúvel de *Leishmania infantum*

Formas promastigotas de *Leishmania infantum* foram cultivadas em meio Schneider suplementado com 20% de Soro fetal bovino, 1 % de antibiótico (10.000UI/mL de penicilina + 10 mg/mL de estreptomicina) e 2% de urina em garrafas de Roux. Os parasitos foram cultivados em estufa BOD (SHEL LAB, model 2020) a 26 °C até atingir a fase estacionária (6 dias de cultivo).

Todo o volume da cultura foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e centrifugado a 800 g, por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet de parasito em 5 mL de tampão fosfato (PBS) estéril. Posteriormente, nova centrifugação foi realizada e então desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet de parasito em 1 mL de água Milli-Q, transferindo-se o volume para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Após esta etapa, seguiram-se sucessivos ciclos (3x) de congelamento (15 minutos a -20° C) e descongelamento (15 minutos a temperatura ambiente). Logo após, a amostra foi sonicada com 3 pulsos de 15 segundos e centrifugada novamente a 800 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e o pellet foi desprezado. Foi adicionado 800 µL de coquetel de inibidor de protease (Protease inhibitor cocktail P9599) e então armazenado a -80° C para uso posterior.

4.5.2 Dosagem de proteínas e antígeno solúvel de *Leishmania*

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método colorimétrico (Bradford), na qual preparou-se uma curva de diluição seriada com concentrações já conhecidas de albumina sérica bovina (BSA) e junto colocou-se as amostras para determinação da concentração destas.

Padões	BSA (1mg/mL)
35 µg/mL	8,5 µL de BSA + 241,3 µL de água Milli-Q
30 µg/mL	7,5 µL de BSA + 242,5 µL de água Milli-Q
25 µg/mL	6,25 µL de BSA + 243,75 µL de água Milli-Q
20 µg/mL	5 µL de BSA + 245 µL de água Milli-Q
15 µg/mL	3,75 µL de BSA + 246,25 µL de água Milli-Q
10 µg/mL	2,5 µL de BSA + 247,5 µL de água Milli-Q
5 µg/mL	1,25 µL de BSA + 248,75 µL de água Milli-Q

Feito as diluições da curva padrão em eppendorfs de 0,5 mL, foi distribuído 150 µL de cada diluição em uma placa de 96 poços de fundo chato. Posteriormente, foi adicionado 3 µL de cada amostra de concentração proteica conhecida (dos animais) e adicionou-se 147 µL de água Milli-Q. Em seguida, acrescentou-se 150 µL do Reagente Comassie Plus Protein (Bradford) em todos os poços. A placa foi lacrada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. E por fim, realizou-se a leitura da placa no leitor de ELISA à 595nm.

4.5.3 Sensibilização da placa de 96 poços

Utilizou-se placas de alta afinidade (Costar 3590) com SLA na concentração de 500 ng/poço diluído em PBS 1x com volume final de 100µL/poço. As placas foram incubadas “overnight” a 4°C embalada com papel filme para evitar evaporação. No dia seguinte, descartou-se o excesso de antígeno; e as placas foram mantidas a -20°C para posterior uso.

4.5.4 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Após cultivo das Leishmanias, preparação de antígeno e sensibilização da placa, foi realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem das imunoglobulinas.

As amostras obtidas foram testadas em triplicata para cada imunoglobulina, IgA, IgE, IgG1, IgG2 e IgM. Cada anticorpo será conjugado anteriormente com a enzima peroxidase (HRP). Após cada etapa, as placas serão lavadas três vezes com PBS-T. O bloqueio será feito com solução de leite desnatado a 3% em PBS e as placas incubadas em câmara úmida durante 2 horas à 37°C. As amostras de soro-padrão e soro-teste serão adicionadas e aplicadas em duplicata, no volume de 100 µL/poço, na concentração de 1:400, 1:40, 1:80 e 1:200 para IgG, IgE, IgA e IgM respectivamente. As placas serão incubadas à 37°C durante 1 hora em câmara úmida. Os anticorpos conjugados (anti-IgG, anti-IgE, anti-IgA e anti-IgM de cão) serão adicionados no volume de 100 µL por poço, na concentração de 1:2000, 1:5000, 1:10000 e 1:100000 respectivamente, sendo incubadas à 37°C, durante 45 minutos em câmara úmida. O revelador contendo substrato e o cromógeno pNPP para IgG e TMB (BD) para IgE, IgA e IgM adicionados no volume de 100 µL por poço e incubados à temperatura ambiente no escuro, até o desenvolvimento de cor. A reação será interrompida por solução de ácido sulfúrico 2N-50µL/poço.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Tukey serão empregados para avaliação entre os grupos relacionados e os resultados obtidos. Os testes estatísticos serão realizados considerando níveis de significância de 5%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Triagem dos Animais

A população estudada foi composta por 40 cães, provenientes do Hospital Veterinário “Francisco Edilberto Uchôa Lopes” – UEMA, bem como de Clínicas Veterinárias e domicílios da cidade de São Luís, Maranhão. Desses animais, 45% eram machos (18/40) e 55% fêmeas (22/40). Quanto a idade, os animais incluídos no estudo possuíam faixa etária entre 6 meses e 3 anos de idade, dos quais 42,5% (17/40) haviam idade inferior a 1 ano, 42,5% (17/40) possuíam entre 1 e 2 anos de idade e 15% (6/40) com idade superior a 2 anos. Os animais foram selecionados sem levar em consideração aspecto racial (Tabela 1).

Variáveis		Nº de animais (%) (n = 40)
Raça	SRD	19 (47,5%)
	CRD	21 (52,5%)
Sexo	Macho	18 (45%)
	Fêmea	22 (55%)
Faixa etária	6 meses – 1 ano	17 (42,5%)
	1 ano – 2 anos	17 (42,5%)
	2 anos – 3 anos	6 (15%)

Tabela 1. Números absolutos e porcentagens de cães infectados por *Leishmania* spp. relacionados às variáveis raça, sexo e faixa etária.

Legenda: SRD (sem raça definida), CRD (com raça definida).

Fonte: Produzida pela autora (2018).

Dentre os cães positivos para leishmaniose visceral, não foi observado predisposição racial ou de gênero, visto que o padrão de cães com e sem raça definida acometidos foi homogêneo, sendo 19 cães (47,5%) SRD e 21 (52,5%) CRD, onde 18 (45%) dos animais acometidos eram machos, enquanto 22 (55%) eram fêmeas.

Os dados obtidos estão de acordo com Gontijo e Melo (2004), Barbosa et al. (2010) e Dias et al. (2018) que relatam que não há evidências da predisposição da doença em cães, quanto ao gênero e raça. Discordando de Mattos et al. (2006) os quais observaram uma frequência maior em cães com raça definida; e diferindo também do que foi encontrado por Julião et al. (2007), Almeida (2009), Mattos et al. (2008) e

Amora et al. (2006) que observaram diferença significativa entre sexos para infecção por *Leishmania* sp., sendo os machos os mais frequentemente parasitados, justificando esse fato não por uma predisposição de gênero, mas devido a população preferir criar cães machos, por conta da procriação indesejada e por serem melhores cães de guarda. Em contrapartida, estudos realizados em 2003, por Amora et al., no Nordeste do Brasil, mostraram uma maior infecção em fêmeas.

6.2 Exame clínico

Cem por cento dos animais examinados foram classificados como sintomáticos ou assintomáticos por meio de avaliação clínica. Os sinais clínicos comumente observados nos animais positivos sintomáticos para leishmaniose visceral (GS) e positivos tratados com Miltefosina (GT) foram: linfadenopatia (85%), seguido de onicogribose (75%), caquexia (60%), descamação (45%), mucosas hipocoradas (30%), lesão em ponta de orelha e/ou focinho (25%), lesão periocular (25%) e oftalmopatia (20%), respectivamente (Tabela 2).

Dentre as principais alterações cutâneas observadas, podemos destacar: descamação (9/20), lesão em ponta de orelha e/ou focinho (5/20), lesão periocular (5/20) e alopecia (4/20).

Sinais clínicos	Nº de animais (%) (n = 20)
Linfadenopatia	17 (85%)
Onicogribose	15 (75%)
Caquexia	12 (60%)
Descamação	9 (45%)
Mucosas hipocoradas	6 (30%)
Lesão em ponta de orelha e/ou focinho	5 (25%)
Lesão Periocular	5 (25%)
Oftalmopatia	4 (20%)
Alopecia	4 (20%)
Epistaxe	3 (15%)

Tabela 2. Sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral canina sintomáticos e submetidos ou não a tratamento com a Miltefosina.

Os principais sinais clínicos observados nos cães avaliados no presente estudo, foram compatíveis aos descritos por Slappendel et al. (1990), Alves e Faustino (2005), Albuquerque et al. (2007), Silva et al. (2010), Castro et al. (2012), Borges (2014) e Figueiredo et al. (2014).

Braga et al. (2015) apontaram como os principais sinais clínicos encontrados em cães com LV, em Curitiba-PR, alopecia, onicogribose, caquexia e emaciação, apatia, ceratoconjuntivite, seguidos de úlcera cutânea, linfadenopatia, dilatação abdominal e diarreia. As manifestações dos sinais clínicos nos cães avaliados demonstram uma diversidade de fatores associados à leishmaniose visceral canina. A avaliação minuciosa desses sinais, bem como exames hematológicos, bioquímicos, sorológicos e parasitológicos são essenciais para a concretização de um diagnóstico precoce e preciso, principalmente em regiões endêmicas.



Figura 8. Sinais clínicos apresentados por cães sintomáticos positivos para leishmaniose visceral, São Luís, Maranhão, 2018. A: Caquexia. B: Onicogribose. C e B: Apatia, caquexia, lesão periocular e nasal, oftalmopatia.

Fonte: produzido pela autora (2018).

Foi constatado ainda que todos os animais sintomáticos apresentaram mais de um sinal clínico simultaneamente, o que agravava o quadro clínico desses animais, potencializando a infecção. A ocorrência de mais de um sinal clínico nos animais é comum e relatada por diversos trabalhos (MATTOS JR et al, 2004; FREITAS et al, 2012). A frequência da associação entre os demais sintomas está representada na Figura 9.

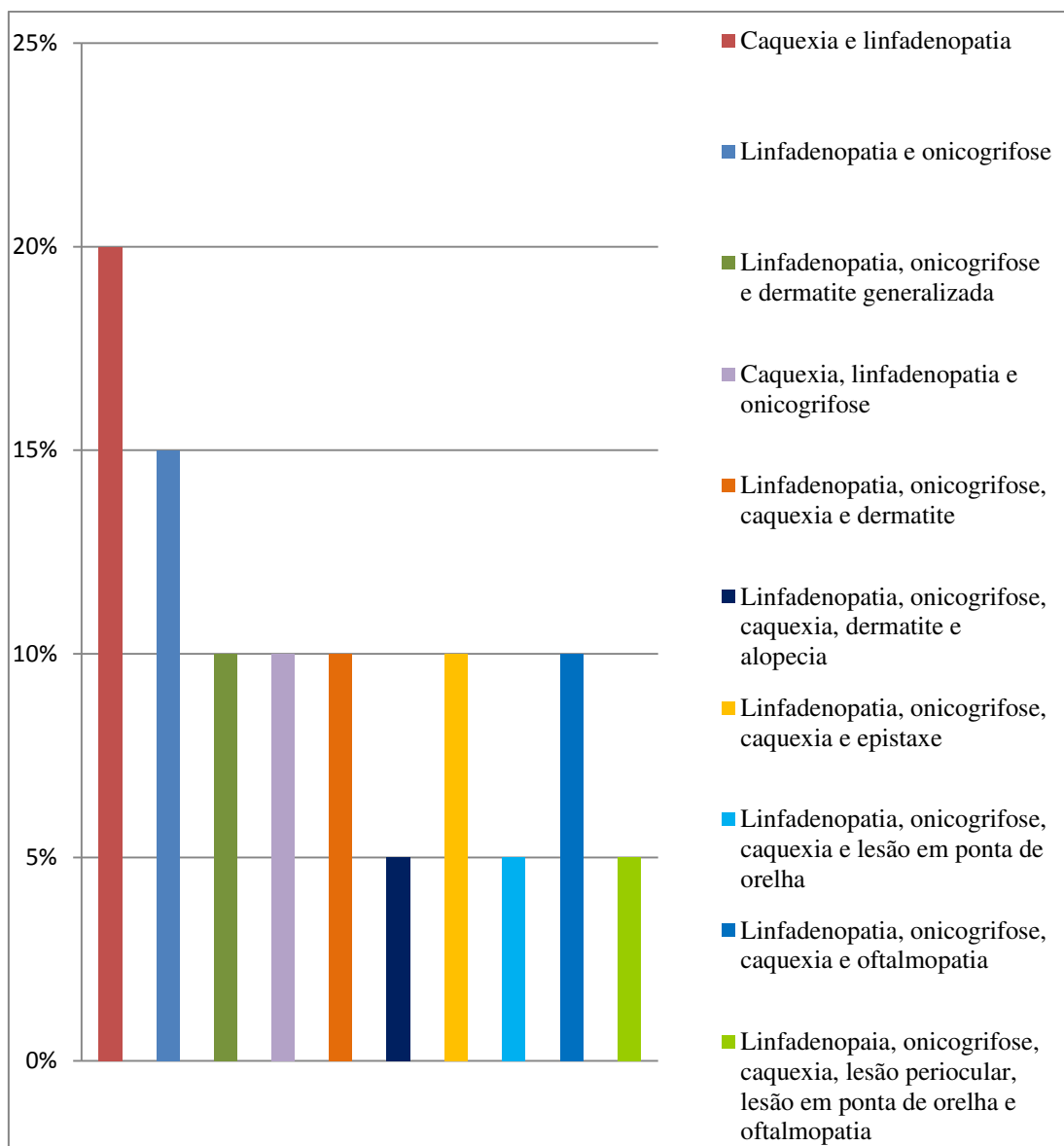


Figura 9. Frequência de sinais clínicos concomitantes observados em cães positivos para leishmaniose visceral.

A avaliação hematológica e bioquímica dos cães livres de infecção por *L. infantum* (vacinados) não apresentaram alterações. Em contrapartida, o estudo hematológico e bioquímico dos cães com leishmaniose visceral demonstraram alterações importantes, refletindo no comprometimento da saúde desses animais.

6.3 Hemograma completo e análises bioquímicas dos cães positivos para leishmaniose visceral e sintomáticos

Na análise hematológica dos cães positivos para leishmaniose visceral e sintomáticos foram observadas alterações em 100% dos animais (10/10). As principais alterações constatadas no eritrograma foram: diminuição na quantidade de eritrócitos, além da redução no teor de hemoglobina e/ou hematócrito, caracterizando, portanto, um quadro de anemia normocítica normocrômica em seis cães (70%), visto que os valores de H.G.M, V.G.M e CHGM apresentavam-se normais. Esses resultados estão de acordo com Feitosa et al. (2003), Kiral et al. (2004) e Alves et al. (2009) onde descreveram a anemia como a mais frequente alteração hematológica em cães com leishmaniose. Sendo assim, algumas das possíveis causas de anemia associadas à LVC são: quadros hemorrágicos, hemólises, processo inflamatório, epistaxe, ulceração cutânea, insuficiência renal, doença crônica, aplasia ou hipoplasia medular.

Além disso, no presente estudo observou-se monocitopenia em 60% (6/10) dos cães avaliados, leucopenia e linfopenia em 40% (4/10) e neutropenia em 30% (3/10) dos animais. Segundo Bush (2004), o quadro de linfopenia pode ser justificado na LVC em decorrência do confinamento temporário de linfócitos no baço e/ou linfonodos. Os resultados obtidos no leucograma são semelhantes aos de Torrecilha et al. (2016), onde na avaliação de cães reagentes e sintomáticos observou monocitopenia, linfopenia e eosinopenia nesses animais.

No que diz respeito ao leucograma, os parâmetros supracitados não se apresentam como bons marcadores clínico-patológicos na LVC, visto que não demonstram um padrão homogêneo nesta infecção (COSTA-VAL et al., 2007; ALVES et al., 2009). Em discordância, Nicolato et al. (2013), apotam a anemia, eosinopenia, linfopenia e monocitopenia como importantes marcadores da disfunção hematológica associada à apresentação severa da infecção por *Leishmania* sp.

O aumento dos níveis de eosinófilos foi encontrado em 1 cão (10%). Esse achado é tipicamente observado, estando correlacionado a presença de sinais dermatológicos ou a presença de doenças parasitárias (OLIVEIRA & POLI NETO, 2004). Enquanto a eosinopenia, também observada no presente estudo (2/10) pode estar associada a condições de estresse mediado por cortisol (FEITOSA et al., 2003; KIRA et al., 2004; ALVES et al., 2009).

Os cães sintomáticos não expressaram níveis séricos de bastonetes, apresentando assim, esse parâmetro dentro da normalidade. Houve ainda, redução considerável no perfil plaquetário em 70% (7/10) desses cães, conforme demonstrado na tabela 3.

Esse achado laboratorial foi considerado expressivo, acometendo grande parte dos cães sintomáticos, concordando com os resultados de Slappendel (1988) e Ciaramela et al., (2003). Em contrapartida, Costa-Val et al., (2007) e Ribeiro et al., (2007) não observaram diferenças nos níveis de plaquetas entre os cães assintomáticos e sintomáticos.

Na avaliação do perfil bioquímico dos animais, 90% destes apresentaram alterações significativas, demonstrando comprometimento tanto da função hepática, quanto renal. Níveis elevados de ureia foram observados em 60% (6/10) dos cães. Níveis séricos de creatinina também se apresentaram aumentados em 70% desses animais. Os dados obtidos estão de acordo com Costa-Val (2004) que obteve valores elevados de ureia sérica, indicando nefropatia inicial, sofrendo injúrias pela ação de deposição de imunocomplexos e pela proteinúria nos animais experimentalmente avaliados. Divergindo dos resultados encontrados por Coutinho (2005) em estudo realizado em uma região endêmica para leishmaniose visceral canina, onde os cães avaliados apresentaram taxas de ureia dentro da normalidade, não demonstrando evidências de alterações renais significativas nesses animais. Solano-Gallego et al. (2011) apontam que apesar da alta prevalência de doença renal em cães, os achados laboratoriais compatíveis com aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina são relativamente raros, divergindo do que se observou no presente estudo.

As enzimas hepáticas AST e ALT foram encontradas acima dos valores de referência em 70% (7/10) e 60% (6/10) dos cães, respectivamente. Em 80% (8/10) dos cães os níveis séricos de fosfatase alcalina se mantiveram dentro da normalidade (Tabela 4). Perfis compatíveis com lesão hepática já vêm sendo descritas na literatura

como um importante achado na infecção por *Leishmania*, estado de acordo com os achados de Torrecilha et al. (2016), encontrando disfunção hepática em 83,3% dos cães estudados. Noli (1999) sugere que o aumento destas enzimas hepáticas implica na tentativa de manutenção da viabilidade e regeneração dos hepatócitos, podendo ser usada como biomarcadores de evolução da infecção.

No que se refere ao perfil de proteínas totais e frações, como albumina e globulina, considerou-se hiperproteinemia em 50% (5/10) dos cães sintomáticos, seguidos de hiperglobulinemia em 50% (5/10) e hipoalbuminemia em 40% (4/10) dos cães. Esses resultados foram similares aos encontrados por Torrecilha et al. (2016).

O aumento nos níveis séricos de proteína é decorrente de uma resposta imune humoral com estimulação policlonal de linfócitos B, havendo, portanto, um aumento de globulina, diminuição de albumina e inversão na relação albumina/ globulina (REIS et al., 2006; SILVA et al., 2008).

6.4 Hemograma completo e análises bioquímicas dos cães positivos para leishmaniose visceral e assintomáticos

A análise individual dos resultados demonstrou alterações hematológicas em 20% (2/10) dos animais assintomáticos. As principais alterações encontradas foram: redução dos níveis de eritrócitos em 20% (2/10) dos cães, diminuição de hematócrito (10%) e hemoglobina (10%).

Os níveis séricos de plaquetas apresentavam-se reduzidas em 40% dos cães, caracterizando um quadro de trombocitopenia. Esses resultados são similares aos obtidos por Vieira et al. (2011) verificando a redução no perfil plaquetário em cães reagentes e assintomáticos.

No leucograma dos animais avaliados, poucas alterações foram observadas, como neutropenia e leucocitose em 20% (2/10) dos cães, e neutrofilia com desvio a esquerda em 10% (1/10) dos cães avaliados, caracterizado pela presença de bastonetes acima dos valores de referência (Tabela 5).

No perfil bioquímico foram observados aumento de AST e ALT em 30% (3/10) e 10% (1/10) respectivamente. Os níveis de ureia, fosfatase alcalina e globulina nos cães apresentam-se dentro da normalidade em 100% (10/10) dos animais e a creatinina em 90% (9/10).

Proteínas totais e globulina apresentaram-se elevadas em 3 cães (30%), seguidas de hipoalbuminemia em 30% (3/10) dos animais, conforme expressado na tabela 6. A hiperproteinemia em cães assintomáticos se dá em decorrência do número de anticorpos, logo após o início da infecção (VIEIRA et al., 2011). De modo geral, animais reagentes para LV e assintomáticos tendem a manter parâmetros laboratoriais sem maiores alterações, similares ao de animais hígidos.

Quando as médias dos valores do eritrograma (quantidade de hemácias, concentrações de hemoglobina e valores de hematócritos) e leucograma dos grupos de cães positivos assintomáticos, sintomáticos e sadios foram comparados, não foram observadas diferenças estatísticas no que diz respeito a esses parâmetros entre os grupos avaliados ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Na avaliação do perfil plaquetário dos três grupos avaliados, constatou-se que a média das plaquetas nos cães positivos assintomáticos e sintomáticos foram

significativamente inferiores ($P < 0,05$) quando comparados ao grupo de cães sadios (Tabela 3).

Parâmetros	Cães sadios $\bar{X} + \sigma$	Cães positivos assintomáticos $\bar{X} + \sigma$	Cães positivos sintomáticos $\bar{X} + \sigma$	Valores de referência*
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	6,01±0,37	5,8±0,52	5,12±1,44	5,5 - 8,5
Hemoglobina (g%)	15,31±1,56	13,2±1,67	11,505±2,78	12 - 18
Hematócrito (%)	40,34±3,11	43,09±5,46	34,79±8,61	37 - 55
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	12.419±2.551,9	11.305±5.291,8	11.621±3.463,6	6.000 - 17.000
Segmentados (%)	7.945,6±2.496,8	6.338,9±3.705	2.220,6±2.018,1	3.000 - 11.500
Eosinófilos (%)	525,8±351,0	403,4±306,3	710,6±388,3	100 - 1.250
Linfócitos (%)	2.863,10±2.496,8	2.420,4±1.965,2	4.058,80±1.433,2	1.000 - 4.800
Plaquetas (mm^3)	271.000 ±40.328,6 ^{b,c}	231.500±92.421 ^{a,c}	251.990± 71.795,9 ^{a,b}	200.000 - 900.000

Tabela 3. Média dos valores hematológicos dos cães positivos assintomáticos, sintomáticos e sadios.

*Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

^a Diferença estatística significativa comparada ao grupo dos cães sadios ($P < 0,05$)

^b Diferença estatística significativa comparada ao grupo dos cães positivos assintomáticos ($P < 0,05$)

^c Diferença estatística significativa comparada ao grupo dos cães positivos sintomáticos ($P < 0,05$)

Na avaliação da média dos valores de ureia, AST, ALT e fosfatase alcalina dos grupos avaliados, observou-se alteração estatística significativa quanto a estes parâmetros no grupo dos cães positivos sintomáticos quando comparado ao grupo de cães assintomáticos e sadios ($P < 0,05$) (Tabela 4).

Em relação aos demais parâmetros bioquímicos avaliados (creatinina, proteínas totais, albumina e globulina), não foram observados diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre o grupo de cães assintomáticos, sintomáticos e sadios.

Parâmetros	Cães saudáveis $\bar{X} + \sigma$	Cães positivos assintomáticos $\bar{X} + \sigma$	Cães positivos sintomáticos $\bar{X} + \sigma$	Valores de referência*
Ureia (g/dL)	32,4±5,5 ^c	28,52±4,3 ^c	57,33±46,2 ^{a,b}	21,4 - 59,92
Creatinina (mg/dL)	0,98±0,3	0,72±0,2	1,35±0,67	0,5 - 1,5
AST (UI/L)	36,38±4,1 ^c	39,7±11,2 ^c	61,64±26,7 ^{a,b}	21 - 45
ALT (UI/L)	33,19±6,3 ^c	41,8±20,1 ^c	65,64±40,9 ^{a,b}	21 - 86
Fosfatase alcalina (UI/L)	81,4±31,9 ^c	75,3±20,1 ^c	116±82,9 ^{a,b}	20 - 156
Proteínas totais (g/dL)	6,99±0,4	6,94±0,7	7,59±1,7	5,4 - 7,7
Albumina (g/dL)	2,81±0,37	2,45±0,5	2,3±0,1	2,3 - 3,8
Globulina (g/dL)	4,18±0,6	4,49±1,0	5,28±1,9	2,3 - 5,2

Tabela 4. Média dos valores bioquímicos dos cães positivos assintomáticos, sintomáticos e saudáveis.

*Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

^aDiferença estatística significativa comparada ao grupo dos cães saudáveis ($P < 0,05$)

^bDiferença estatística significativa comparada ao grupo dos cães positivos assintomáticos ($P < 0,05$)

^cDiferença estatística significativa comparada ao grupo dos cães positivos sintomáticos ($P < 0,05$)

6.5 Hemograma completo e análises bioquímicas dos cães positivos para leishmaniose visceral antes e após terapia com Miltefosina

Antes do tratamento, ao analisarmos a série vermelha, observamos que o quadro de anemia, caracterizado pela diminuição da contagem de hemácias, redução do teor de hemoglobina e/ou diminuição dos níveis de hematócrito estava presente em 70% dos animais avaliados.

Os níveis séricos de plaquetas se mantiveram dentro da normalidade em 90% dos cães, sendo apenas 1 animal apresentando quadro de trombocitopenia e todos os outros apresentando-se nos valores de referência.

No leucograma, observou-se leucocitose em 30% (3/10), eosinofilia em 40% (4/10) e linfocitose em 70% (7/10) dos cães. Os níveis séricos de neutrófilos

estavam enquadrados dentro dos valores de referência em 80% (8/10) dos animais (Tabela 7).

Nas análises bioquímicas antes do tratamento, revelaram níveis séricos de ureia, creatinina, ALT e fosfatase alcalina dentro da normalidade. No entanto, foi demonstrado um aumento da enzima AST em 60% dos animais.

O perfil sérico de proteínas totais e globulina apresentaram-se elevados em 4 cães (40%); e redução nos níveis de albumina foram observados igualmente em 4 animais (40%) (Tabela 8).

Após o tratamento dos cães com a Miltefosina, novos exames hematológicos e bioquímicos foram realizados. Quando comparados aos exames anteriores, foi observada uma melhora em relação a alguns parâmetros avaliados.

No eritrograma desses animais, 40% (4/10) demonstraram redução de eritrócitos e 30% (3/10) de hemoglobina e hematócrito. Quando comparados os três parâmetros hematológicos realizados antes e após o tratamento, notou-se que 2 (20%) cães apresentaram melhora nesses parâmetros avaliados e 1 (19%) apresentou piora. Manna et al. (2009) aponta redução de hematócrito como sendo um dos efeitos colaterais observados no tratamento de cães com Miltefosina.

Quanto ao perfil leucocitário, observou-se leucocitose em 30% (3/10) dos animais avaliados. No entanto, 2 animais (20%) obtiveram melhora após a realização da terapia medicamentosa. O quadro de neutrofilia e trombocitopenia mantiveram-se homogêneos comparados aos exames anteriores, estando presentes em 10% (1/10) dos cães. No entanto, os animais que apresentaram essas alterações antes do tratamento foram distintos dos que a possuíam após a terapia.

Diferentemente dos exames iniciais, 30% (3/10) dos cães apresentaram eosinofilia e 40% (4/10) apresentaram linfocitose (Tabela 9). Quando comparados aos exames anteriores ao tratamento, observou-se uma melhora nesses parâmetros em 1 (10%) cão quanto aos níveis séricos de eosinófilos, em 3 (30%) quanto as taxas de linfócitos, mantendo assim, esses parâmetros dentro da normalidade após o tratamento.

Na avaliação individual dos parâmetros bioquímicos, foi observada uma melhora em alguns animais, onde os níveis de ureia, ALT e fosfatase alcalina não oscilaram após o tratamento, permanecendo dentro do intervalo de referência. Observou-se ainda, redução do nível sérico de creatinina em 10% (1/10) dos animais e aumento de AST em 30% (3/10) dos cães.

Hiperproteinemia e hiperglobulinemia foram encontradas em 30% dos cães (3/10) associados à hipoalbuminemia em 20% dos animais avaliados (2/10) (Tabela 10). Esses resultados demonstraram melhora nesses parâmetros avaliados em 2 (20%) cães, no entanto, outro animal que apresentava normalidade nesses parâmetros antes do tratamento, após o mesmo, mostrou-se alterado.

De modo geral, os resultados obtidos após o tratamento dos cães demonstraram um padrão variável de resposta, havendo a manutenção ou melhora no perfil bioquímico desses animais, firmando a baixa nefrotoxicidade e hepatotoxicidade já referida na literatura sobre o uso da Miltefosina em cães. No entanto, efeitos colaterais leves foram observados durante o tratamento no presente estudo, principalmente relacionados à alterações gastrointestinais (ême, vômitos e diarreia) nesses animais, igualmente já descritos (REGUERA et al., 2016).

Segundo Reguera et al. (2016) o uso da Miltefosina de indiscriminada pode oferecer riscos de toxicidade aos cães, além de falhas terapêuticas e quadros de recidivas. Estudos com modelos animais e humanos demonstraram ainda toxicidade reprodutiva, refletindo em teratogênias e fetotoxicidade.

Embora dados hematológicos e bioquímicos para avaliação das funções renal e hepática dos cães com LVC não sejam conclusivos no diagnóstico da doença, estes parâmetros fornecem um embasamento essencial para avaliação e acompanhamento do prognóstico da enfermidade em cães positivos e evolução em cães tratados (COSTA-VAL et al., 2007).

Não foram observadas alterações estatísticas significativa na média dos parâmetros hematológicos no grupo de cães positivos antes e após o tratamento com a Miltefosina ($P < 0,05$).

A média da quantidade de plaquetas dos cães positivos antes da terapia com a Miltefosina apresentou diferença estatística significativa ($P < 0,05$) quando comparados aos exames realizados após o tratamento (Tabela 5).

Parâmetros	Cães positivos antes do tratamento $\bar{X} + \sigma$	Cães positivos após tratamento $\bar{X} + \sigma$	Valores de referência *
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	4,94±0,5	5,3±0,4	5,5 - 8,5
Hemoglobina (g%)	12,1±2,2	12,16±1,3	12 – 18
Hematócrito (%)	35,95±3,4	37,08±1,62	37 – 55
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	14.709±4.567,2	13.820±3.935,5	6.000 - 17.000
Segmentados (%)	7.560,8±3.177,9	7.456,2±3.157,6	3.000 – 11.500
Eosinófilos (%)	1.034±722,5	1.112,5±1.194,4	100 - 1.250
Linfócitos (%)	6.245,7±2.428,5	5.091,7±1.857,6	1.000 - 4.800
Plaquetas (mm^3)	308.700±83.732,9 ^a	272.780±57.393,3	200.000 - 900.000

Tabela 5. Média dos valores hematológicos dos cães positivos antes e após o tratamento com Miltefosina.

*Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

^aDiferença estatística significativa entre os grupos avaliados ($P < 0,05$)

Quanto às análises bioquímicas para a avaliação das funções hepática e renal não houve diferença significativa entre o grupo de cães positivos antes e após o tratamento ($P < 0,05$).

Parâmetros	Cães positivos antes do tratamento $\bar{x} + \sigma$	Cães positivos após tratamento $\bar{x} + \sigma$	Valores de referência*
Ureia (g/dL)	37,97±8,7	34,1±9,5	21,4 - 59,92
Creatinina (mg/dL)	0,87±0,3	0,77±0,2	0,5 - 1,5
AST (UI/L)	54,69±30,3	56,07±34,14	21 - 45
ALT (UI/L)	48,19±14,3	47,89±16,5	21 - 86
Fosfatase alcalina (UI/L)	84,2±45,1	62,5±41,0	20 - 156
Proteínas totais (g/dL)	7,33±0,7	7,18±0,9	5,4 - 7,7
Albumina (g/dL)	2,38±0,44	2,57±0,51	2,3 - 3,8
Globulina (g/dL)	4,95±0,98	4,61±1,2	2,3 - 5,2

Tabela 6. Média dos valores bioquímicos dos cães positivos antes e após o tratamento com Miltefosina.

*Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

^aDiferença estatística significativa entre os grupos avaliados ($P < 0,05$)

6.6 Hemograma completo e análises bioquímicas dos cães sadios antes e após vacinação com Leish-Tec®

Os exames laboratoriais dos cães hígidos antes da vacinação se apresentaram dentro da normalidade em 100% (10/10) dos cães avaliados neste grupo, onde nenhum animal apresentou alterações no perfil hematológico e/ou bioquímico.

Após a vacinação, 30% (3/10) apresentaram um quadro de linfocitose. Comparando os valores antes e após a vacinação, observou-se que 90% dos cães apresentaram níveis de linfócitos acima dos valores apresentados anteriormente, no qual 20% (2/10) apresentaram aumento que excedeu os valores de referência.

Observou-se ainda um aumento nos níveis séricos de proteínas plasmáticas, no entanto os valores ainda permaneceram dentro da normalidade em 100% (10/10) dos

cães. Todos os demais parâmetros apresentaram-se dentro dos valores de referência tanto antes quanto após o protocolo de vacinação.

O aumento dos níveis de linfócitos pós-vacina já vem sendo descrito na literatura, visto que os compostos vacinais disponíveis para utilização até o momento são capazes de gerar uma resposta imune protetora, com a ativação de linfócitos T (KROEGER et al., 2012).

7 CONCLUSÕES PARCIAIS

Diante dos resultados expostos até o presente momento, podemos concluir que:

- Cães positivos para leishmaniose visceral sintomáticos apresentaram alterações laboratoriais importantes, como anemia, hiperproteinemia e trombocitopenia. Esses achados são importantes marcadores, associados aos sinais clínicos característicos da doença, para auxiliar no diagnóstico da leishmaniose visceral canina e avaliação do prognóstico.
- Cães positivos para leishmaniose visceral também apresentaram alterações hematológicas e bioquímicas, no entanto, foram menos expressivas quando comparados aos animais do grupo sintomático.
- Os cães pertencentes ao grupo positivo para LVC e tratados demonstraram um padrão variável de resposta, apresentando melhora ou não nos perfis hematológicos e bioquímicos após o tratamento com Miltefosina.

REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, A. L.; LIMA, T. B.; MACEDO, A. A.; MORAES-JÚNIOR, F. J.; DIAS, E. L.; BATISTA, Z. S. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 197-203, 2008.

AKHOUNDI, MOHAMMAD et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. 43-49, 2016.

ALBUQUERQUE, A. L.; ARAGÃO, F. R.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES, Y. M.; LIRA, R. A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L. C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, v. 71, p. 78-84, 2007.

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

ALMEIDA, A. B. P. F. **Inquérito soropidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Sanidade de Animais Domésticos e Selvagens, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá-MG, Brasil, p. 67, 2009.

ALMEIDA PS, NASCIMENTO JC, FERREIRA AD, MINZÃO LD, PORTES F, MIRANDA AM, FACCENDA O, ANDRADE FILHO JD. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**; vol. 54, n. 2, p. 304–310, 2010.

ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose visceral canina. **Manual da Schering-Plough**, São Paulo, p. 14, 2005.

ALVES, C.F., DE AMORIM, I.F., MOURA E.P., RIBEIRO R.R., MICHALICK M.S., KALAPOTHAKIS, E., et al. Expression of IFN gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V. 128, n. 4, p. 349-358, 2009.

AMORA, S. S. A.; SANTOS, M. J. P.; ALVES, N. D.; COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em áreas endêmicas do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1854-1859, 2006.

ANDRADE, H. M. et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 83-90, 2011.

ASHFORD DA, BOZZA M, FREIRE M, MIRANDA JC, SHERLOCK I, EULÁLIO C, LOPES U, FERNANDES O, DEGRAVE W, BARKER-JR RH, BADARÓ R, DAVID JR. Comparison of the polymerase and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.

AZEVEDO, J. **Aspectos comparativos das alterações histopatológicas de cães com diagnóstico presuntivo para leishmaniose visceral canina**. v. 1, n. 04, 2007.

BADARÓ R.; DUARTE M.I.S. **Leishmaniose Visceral (Calazar)**. v. 97, p. 1234 – 1255, 1986.

BARBOSA DS, ROCHA A.L, SANTANA A.A, et al. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no Município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 653-659, 2010.

BEST MP, ASH A, BERGFELD J, BARRETT J. The diagnosis and management of a case of leishmaniosis in a dog imported to Australia. **Veterinary Parasitology**. v. 202, n. 3-4, p. 292–5, 2014 .

BORGES, L. F. N. M. et al. Prevalência e distribuição especial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 352-357, 2014.

BRAGA, G.A; FERNANDES TF, FAUSTINO SMJ, LIMA MVSL, COSTA CPSG. Leishmaniose visceral em cães naturalmente infectados no Município de Imperatriz, Maranhão, Brasil. 42º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária e 1º Congresso Sul-Brasileiro da ANCLIVEPA. p. 1713 -1717.

BUSH, B. M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. São Paulo. Roca, p. 376, 2004.

CAMARGO-NEVES VLF. Leishmaniose visceral americana: Doença emergente no estado de São Paulo. Com ciência: Revista Eletrônica de Jornalismo Científico [online]. p. 1-4, 2005. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/2005/06/17.shtml>>. Acesso em 02/09/2018.

CAMPOS-PONCE M, PONCE C, PONCE E, MAINGON RDC. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on Leishmania tropism in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. **Experimental Parasitology**, New York, v. 109, p. 209–219, 2005.

CARDOSO L, SCHALLIG HDFH, FRANCISCO NETO, KROOM N, RODRIGUES M. Serological survey of Leishmania infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination test (FAST). **Acta Tropica**. n. 91, n. 2, p. 95-100, 2004.

CARDOSO, L.; SCHALLIG, H. D. F. H.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; CABRAL, A.; ALUNDA, J. M.; RODRIGUEZ, M. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune

- responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, p. 35–41, 2007.
- CASTRO IP, SOUSA MVC, MAHALHÃES GM, MINDIM AV, NOLETO PG, PAULA MBC, NETO AAP, MEDEIROS AA. hepatic and proteic profile in dogs with visceral leishmaniasis. **Bioscience Journal.**, Uberlândia, v. 28, n. 5, p. 799-804, 2012.
- CHAGAS, E. Primeira verificação em individuo vivo, da leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil-Médico**, v. 50, p. 221-222, 1936.
- CHAPPUIS F, SUNDAR S, HAILU A, GHALIB H, RIJAL S, PEELING RW, ALVAR J BM. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control ? **Nature reviews microbiology**. v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.
- CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Vet Learn**, v. 25, n. 5, p. 358-368, 2003.
- COELHO, E.A.; TAVARES, C.A.; CARVALHO, F.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infect Immunology**, v.71, n. 7, p. 3988 - 3994, 2003.
- COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO N.; MICHALICK, M.S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636-643, 2007.
- COUTINHO JFV. Estudo clínico-laboratorial e histopatológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* com diferentes graus de manifestação física. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, 2005.
- CROFT SL, SUNDAR S, FAIRLAMB AH. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**. n. 19, v. 1, p. 111-126, 2006.
- DANTAS-TORRES F, SOLANO-GALLEGO L, BANETH G, RIBEIRO VM, DE PAIVA-CAVALCANTI M, OTRANTO D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**. v. 28, n.12, p. 531-538, 2012.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) brazileinsis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2006.
- DIAS RCF, THOMAZ- SOCCOL V, PASQUALI AKS et al. Variables associated with the prevalence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in dogs on the tri-border of Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**, n. Ahead of Print, 2018.

DOUGALL A, SHILTON C, CHOY JL, ALEXANDER B, WALTON S. New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods.

Epidemiology & Infection. v. 137, n. 10, p. 1516–1520, 2009.

FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: um desafio constante. **Informativo Intervet pet**. 2000.

FEITOSA, M.M.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GONÇALVES, M.E.; LIMA, V.M.F.; CIARLINI, P.C. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil): um estudo retrospectivo de 191 casos. **Clínica Veterinária**, v. 47, p. 42-48, 2003.

FERNANDES, A.P.; COSTA, M.M.S.; COELHO, E.A.F.; MICHALICK, M.S.M.; FREITAS, E.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; RESENDE, D.M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C.F.; GAZZINELLI, R.T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

FIGUEIREDO, M. J. F. M. et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal Brasileira**. v. 15, n. 1, p. 102-106, 2014.

FREITAS-JUNIOR, Lucio H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it?. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11-19, 2012.

GÁLVEZ R, MIRÓ G, DESCALZO MA, MOLINA R. Questionnaire-based survey on the clinical management of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). **Preventive Veterinary Medicine**. v. 102, n. 1, p. 59-65, 2011.

GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. Atheneu, São Paulo, v. 10, p. 56-72, 2000.

GHARBI M, MHADHBI M, REJE A, JAOUADI K, ROUA M, DARGHOUH MA. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. **Rev Sci Tech l'OIE**, v. 34, p. 613-626, 2015.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

HANDMAN E, BULLEN DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**. v. 18, n. 8, p 332-334, 2002.

HARHAY MO, OLLIARO PL, COSTA DL, COSTA CHN. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**. v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades@.2018. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=211130>>. Acesso em: 20/08/2018.

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 34-32, 2007.

JULIÃO, F. S. et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 319-324, 2007.

KAUFER A, ELLIS J, STARK D, BARRATT J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**. v.10, n. 1, p. 287, 2017.

KROEGER D.R., RUDULIER C.D., PETERS N.C. & BRETSCHER P.A. Direct demonstration of CD4 T cell cooperation in the primary in vivo generation of CD4 effector T cells. **International immunology**. v. 24, p.: 519–527, 2012.

KIRAL, F.K.; SEYREK, K.; PASA, S.; ERTABAKLAR, H.; UNSAL, C. Some haematological, biochemical and electrophoretic findings in dogs with visceral leishmaniasis. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 155, p. 226-229, 2004.

LAGE RS, OLIVEIRA GC, BUSEK SU, GUERRA LL. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;115:135–45.

LAINSON, R; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R.; RYAN, L; POVOA, M. M.; et al. A *Leishmania* e as Leishmanioses. In: Lainson R, organizador. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Serviços de saúde pública. Belém: **Instituto Evandro Chagas**. v. 1, p. 83-124, 1986.

LAZARI, P. Manual de Vigilância e Controle das Leishmanioses. Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso Superintendência de Vigilância em Saúde Coordenadoria de Vigilância em Saúde Ambiental Gerência de Vigilância de Vetores e Antropozoonoses. Cuiabá. p. 25, 2007.

LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; DUARTE, S. C.; FERNANDES, P. R.; AMARAL, A. V. C.; SOUZA, M. A. Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 69-72, 2005.

LUPPI, M. M.; MALTA, M. C. C.; SILVA, T. M. A.; SILVA, F. L.; MOTTA, R. O. C.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 55, n. 1-2, p. 146-151, 2008.

ROGERS, M.E., M. L. CHANCE PAB. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*. v. 124, n. 5, p. 495-507, 2002.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. P.; LEAL, C. A.; MARZOCHI, M. C. A. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for Leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 8, p. 440-444, 2004.

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
COORDENAÇÃO DE FISCALIZAÇÃO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS-DFIP-
SDA - CPV Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Fiscalização CDE,
Cpv DEPV. Nota técnica no 11/2016/cpv/dfip/sda/gm/mapa, 2016. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em: 05/09/2018.
- MARCONDES M, ROSSI CN. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.
- MARTÍNEZ-MORENO A, MORENO T, MARTÍNEZ-MORENO FJ, ACOSTA L, HERNANDEZ S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, n. 3-4, p. 209-220, 1999.
- MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M.R. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.
- MATTOS JR, D.G.; PINHEIRO, J.M.; MENEZES, R.C.; COSTA, D.A. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 119-122, 2004.
- MATTOS, M. M.; FILGUEIRA, K. D.; AMORA, S. S. A.; SUASSUNA, A. C. D.; AHID, S. M. M.; ALVES, N. D. Ocorrência da leishmaniose visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, v. 16, n.1, p. 51-54, 2006.
- MELO, F.A., MOURA, E.P., RIBEIRO, R.R., ALVES, F., CALIARI V, TAFURI, W.L. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **International journal of experimental pathology**. v. 90, n. 5, p. 538–548, 2009.
- METZDORF, I.P., DA COSTA LIMA, M.S., DE FATIMA CEPA MATOS M, DE SOUZA FILHO, A.F., DE SOUZA TSUJISAKI, R.A., FRANCO, .K.G et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 166, p. 121-125, 2017.
- MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Médica**. Atheneu, São Paulo, c. 10, v. 1, p. 67-83, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília. Editora MS. 1ª Edição p. 12, 2014.
- MIRÓ G, PETERSEN C, CARDOSO L, BOURDEAU P, BANETH G, SOLANO-GALLEGOS L, et al. Novel areas for prevention and control of canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**. v. 33, n. 9, p. 718–730, 2017.
- MONTEIRO EM, FRANÇA-SILVA JC, COSTA RT, COSTA DC, BARATA RA, PAULA EV, et al. Leishmaniose visceral: Estudo de flebotomíneos e infecção canina

em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, p. 147-152, 2005.

MS. Nota Informativa: Tratamento de cães com leishmaniose visceral. v. 1, 2016.

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

NANCI AKEMI MISSAWA, MÁRCIA AURÉLIA ESSER VELOSO, GIOVANA BELEM MOREIRA LIMA MACIEL, ÉRIKA MONTEIRO MICHALSKY ESD. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 44, p. 76-78, 2011.

NAUCKE, T.J & LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & vectors**. v. 5, n. 1, p. 67, 2012.

NICOLATO C, ABREU R, ROATT RT, AGUIAR-SOUSA MO, REIS RD, CARVALHO L E S, COURA-VITAL, W. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82947, 2013.

NOLI C. Leishmaniosis canina. *Waltham Focus*. v. 9 p. 16–24, 1999.

NOLI C, SARIDOMICHELAKIS MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Vet Journal**. v. 202, p. 425–435, 2014.

NORONHA, F.; NUNES, A., C.; SOUZA, K., MELO, M.N.; PINTO J.R. Differential sensitivity of New world *Leishmania* spp. Promastigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides. **Acta tropica**, n. 69, p. 17-29, 1998.

OLIVEIRA, R.A.G.; POLI NETO, A. **Anemias e leucemias**. 1. ed. São Paulo: Roca, p. 93-104, 2004.

PAPADOGIANNAKIS EI, KOUTINAS AF, SARIDOMICHELAKIS MN. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 104, p. 227-237, 2005.

PAPADOGIANNAKIS EI, KOUTINAS AF. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 163, p. 94-102, 2015.

PEARSON RD, SOUSA ADQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**. V. 22, p. 1-13, 1996.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BENADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs

- experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infectious Immunology**. v. 62, p. 229-235, 1994.
- PODINOVSKAIA M, DESCOTEAUX A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **The future Medical Microbiology**. v. 10, p 111-129, 2015.
- QUINNELL RJ, COURTENAY O, SHAW M, DAY MJ, GARCEZ LM, DYE C, et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 183, p. 1421-1424, 2001.
- QUINNELL RJ, SOREMEKUN S, BATES PA, ROGERS ME, GARCEZ LM, COURTENAY O. Antibody response to sand fly saliva is a marker of transmission intensity but not disease progression in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors*. v. 11, p. 7, 2018.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses. *Lutzomyia longipalpis* e a Eco-Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil. v. 6, p. 310-336, 2003.
- REGUERA RM, MORÁN M, PÉREZ-PERTEJO Y, GARCÍA- ESTRADA C, N-Fouce RB. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 227, p. 98–114, 2016.
- REICHMANN MLAB, PINTO HBF, NUNES VFP. Vacinação contra raiva de cães e gatos. São Paulo: Instituto Pasteur (Manuais, 3). 1999.
- REIS A.B.; GIUNCHETTI R.C.; COURA-VITAL W. Antígeno solúvel aplicado ao diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina através da reação imunoenzimática (ELISA). In UFOP, **Instituto Nacional de Tecnologia**, Brasil. p. 84, 2006.
- REIS, A. B., TEIXEIRA-CARVALHO, A., VALE, A. M., MARQUES, M. J., GIUNCHETTI, R. C., MAYRINK , et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 112, p. 102–116, 2006.
- REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**. v. 26, p. 341-349, 2010.
- REITHINGER R, COLEMAN PG, ALEXANDER B, VIEIRA EP, ASSIS G, DAVIES CR. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**. v. 34, p. 55–62, 2004.
- ROSE K, CURTIS J, BALDWIN T, MATHIS A, KUMAR B, SAKTHIANANDESWAREN A, et al. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos:

isolation and characterisation of the causative organisms. **International Journal for Parasitology**. v. 34, n. 6, p. 655–664, 2004.

SANTOS, J. M. L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R. F.; LINO, F. R. L.; ANDRADE, L. S. S.; SOUZA, R. C. A.; BRITO, F. L. C.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. R.; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalence of anti-*leishmania* spp antibodies in dogs from garanhuns, in the middle scrub zone (agreste) of pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 1, p. 41-45, 2010.

SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 95, p. 193-198, 2000.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine Leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**. v. 20, n. 5, p. 471-489, 2009.

Saúde BM da SS de V em S. Guia de vigilância em saúde. v. 3, p. 286, 2017.

WEISS, J. WARDROP . **Schalm's Veterinary Hematology** . 6ª edição. John Wiley & Sons, 2011.

SILVA F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SILVA, A. R. Leishmaniose visceral americana. Evolução de uma Endemia de 1982 a 1985. **Jornada de Parasitologia e Medicina Tropical, São Luís**. Resumos, 9.(Mimeo.), 1986.

SILVA, A. L. A et al. Sobrevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 11, n. 3, p. 653-659, 2010.

SINVAL P. BRANDÃO-FILHO, MARIA E. BRITO, FRANCISCO G. CARVALHO, EDNA A. ISHIKAWA, ELISA CUPOLILLO, LUCILE FLOETER-WINTER JJS. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

SLAPPENDEL, R. J. FERRER, L. Leishmaniosis. In: GREENE, C. E. **Clinical Microbiology and Infetious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: W.B.SaundersCo., p. 450- 8, 1990.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog ad cat**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, Cap. 73, p. 450-458, 1998.

SOLANO-GALLEGO L, MIRÓ G, KOUTINAS A, CARDOSO L, PENNISI MG, FERRER L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**. v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

TORRECILHA, RBP; UTSUNOMIYA YT, BOSCOA, AM, ALMEIDA, BF, PEREIRA PP, NARCISO LG, PEREIRA DCM, BAPTISTIOLLI A, CALVO-BADO A, COURTENAY O, NUNES CM, CIARLINI PC. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 132, p. 83–87, 2016.

VIEIRA NETO, F.A.; SOUSA, A.K.S.; MARQUES, M.V.; ARRUDA, D.S.; SILVA, L.A. Avaliação de parâmetros bioquímicos em cães infectados por *Leishmania chagasi*. Rev. Ciênc. Saúde, São Luís, **Revista de Ciências da Saúde**, v. 13, n. 2, p. 131-140, 2011.

UENO N, WILSON M.E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Parasitology**. v. 28, p. 335–344, 2012.

WERNECK G.L. **Controle da Leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo?** Cadernos de Saúde Pública, v. 32, n.6, 2016.

WERNECK G.L. Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de saúde pública**. v. 48, p. 851-856, 2014.

WHA R, ASSEMBLY WH, STATES M, STATES M, OBSER GH. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2017.

WHO- World Health Organization.. **Second who report on neglected tropical diseases**, p.67, 2013.

WOERLY V, MAYNARD L, SANQUER A, EUN H. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitology research**, v. 105, n. 2, p. 463-469, 2009.

YOUNG DG, LAWYER RG. New World vectors of the leishmaniases. **Current topics in vector research**. Springer, New York, NY, v. 4, p. 29-71, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for dog population management**. Geneva. 1990.

ZANIN F.H.; COELHO, E.A.; TAVARES, C.A.; MARQUES-SILVA, E.A.; SILVACOSTA, M.M.; REZENDE, S.A.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes Infection**, v. 9, n. 9, p. 1070-1077, 2007.

ANEXOS

ERITROGRAMA				LEUCOGRAMA					
Animal	Eritrócitos (5,5 - 8,5 10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (12 - 18 g%)	Hematócrito (37 - 55 %)	Leucócitos (6.000 - 17.000 10 ³ /mm ³)	Eosinófilos (100 - 1.250)	Segmentados (3.000 - 11.500)	Linfócitos (1.000 - 4.800)	Monócitos (150 - 1.350)	Plaquetas (200.000 - 900.000 10 ⁵ /mm ³)
1	8	14,5	48	4.500*	180	3.645	450*	225	180.000*
2	7,64	15,51	48,1	10.700	642	5.564	3.745	749	162.800*
3	6,83	12,4	41,4	5.700*	342	2.021*	2.109	228	180.000*
4	3,6*	7,8*	24*	15.400	48*	875*	2.245	145*	169.000*
5	4,73*	10,5*	28,8*	5.300*	53*	3.869	1.219	159	101.000*
6	4,39*	9,2*	29*	12.600	504	7.056	5.040**	0*	391.000
7	4,12*	10,1*	28,2*	11.340	212	542*	489*	0*	201.000
8	5,25*	13,1	34,9*	6.700	134	5.762	670*	134*	171.000*
9	5,3*	10,61*	35*	8.400	1.428**	4.704	2.268	0*	227.000
10	3,16*	5,4*	19*	4.700*	329	3.760	470*	141*	170.000*

Tabela 7. Resultado do hemograma completo de cães com leishmaniose visceral, sintomáticos.

*Abaixo dos níveis de referência. **Acima dos níveis de referência.

Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

BIOQUÍMICO

Animal	Ureia (21,4 - 59,92 g/dL)	Creatinina (0,5 - 1,5 mg/dL)	AST (21 - 45 UI/L)	ALT (21 - 86 UI/L)	Fosfatase Alcalina (20 - 156 UI/L)	Proteínas totais (5,4 - 7,7 g/dL)	Albumina (2,3 - 3,8 g/dL)	Globulina (2,3 - 5,2 g/dL)
1	48	1,5	83**	92**	100	6,1	2,3	3,8
2	200**	2,3**	52**	73	320**	8,1**	2,2*	5,9**
3	42	1,0	20*	20*	33	5,5	2,3	3,2
4	67**	1,8**	94**	123**	97	9,3**	2,1*	7,2**
5	89**	2,2**	79**	142**	149	7,6	2,3	5,3
6	82**	2,3**	75**	99**	86	8,4**	2,2*	6,2**
7	48	1,7**	91**	104**	142	9,9**	2	7,9**
8	20*	0,4*	41	20*	120	6,9	2,6	4,3
9	76**	2,5**	41,9	41	150	5,5	2,4	3,1
10	95**	2,7**	109**	117**	281**	11,2**	1,9*	9,3**

Tabela 8. Resultado dos testes bioquímicos séricos para avaliação das funções renal e hepática de cães com leishmaniose visceral, sintomáticos.

*Abaixo dos níveis de referência. **Acima dos níveis de referência.

Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

ERITROGRAMA				LEUCOGRAMA						
Animal	Eritrócitos (5,5 - 8,5 10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (12 - 18 g%)	Hematócrito (37 - 55%)	Leucócitos (6.000 - 17.000 10 ³ /mm ³)	Eosinófilos (100 - 1.250)	Bastonetes (0 - 540)	Segmentados (3.000 - 11.500)	Linfócitos (1.000 - 4.800)	Monócitos (150 - 1.350)	Plaquetas (200.000 - 900.000 10 ⁵ /mm ³)
1	5,55	13,1	37,2	6.700	134	0	5.762	670*	134*	171.000*
2	5,9	12,4	55	6.200	362	0	1.914*	1.129	160	245.000
3	4,7*	12,1	47	16.500	825	0	11.415	342*	825	216.000
4	6,67	17,9	49,6	12.700	889	0	7.747	4.064	189	322.000
5	6	12,1	40	6.450	451	0	4.644	1.161	194	180.000*
6	5,8	12,9	40,7	17.700**	177	990**	12.045**	2.124	354	443.000
7	5,8	12,8	40,5	7.200	168	0	3.184	1.848	129*	220.000
8	5,2*	11,7*	36,9*	6.100	0*	0	2.583*	1.517	111*	78.000*
9	6,12	13,2	41	21.000**	236	0	3.232	6.873**	163	190.000*
10	6,3	13,8	43	12.500	792	0	10.863	4.476	220	250.000

Tabela 9. Resultado do hemograma completo de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos.

*Abaixo dos níveis de referência. **Acima dos níveis de referência.

Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

BIOQUÍMICA

Animal	Ureia (21,4 - 59,92 g/dL)	Creatinina (0,5 - 1,5 mg/dL)	AST (21 - 45 UI/L)	ALT (21 - 86 UI/L)	Fosfatase Alcalina (20 - 156 UI/L)	Proteínas totais (5,4 - 7,7 g/dL)	Albumina (2,3 - 3,8 g/dL)	Globulina (2,3 - 5,2 g/dL)
1	22	0,4*	41	20*	89	6,9	2,4	4,5
2	32	0,5	39	29	65	7,1	2,6	4,5
3	31	0,6	49**	22	71	5,8	2,6	3,2
4	23	0,9	36	41	98	8,1**	2,1*	6**
5	30	1,5	47**	31	100	7,8 **	1,3*	6,5**
6	27	0,7	31	52	50	5,65	2,4	3,25
7	37,2	0,8	22	30	43	6,2	2,4	3,8
8	30	0,7	65**	89**	100	7,3**	2*	5,3**
9	25	0,6	31	63	79	6,9	3,6	3,3
10	28	0,5	36	41	58	7,7	3,1	4,6

Tabela 10. Resultado dos testes bioquímicos séricos para avaliação das funções renal e hepática de cães com leishmaniose visceral, assintomáticos.

*Abaixo dos níveis de referência. **Acima dos níveis de referência.

Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

ERITROGRAMA							LEUCOGRAMA									
Animal	Eritrócitos (5,5 - 8,5 10/mm ³)		Hemoglobina (12 - 18 g%)		Hematócrito (37 - 55%)		Leucócitos (6.000 - 17.000 10 ³ /mm ³)		Eosinófilos (100 - 1.250)		Segmentados (3.000 - 11.500)		Linfócitos (1.000 - 4.800)		Monócitos (150 - 1.350)	
	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT
1	5,06	4,31*	14,9	12	40,5	36*	19.400**	18.200**	1.358**	1.456**	9.312	12.740**	8.342**	4.004	388	0*
2	4,55*	5,5	11,9*	11*	37,3	36*	16.200	9.000	2.592**	270	9.720	5.580	3.564	2.880	324	270
3	5,42*	5,2*	15,13	10,1*	40,79	33*	19.397**	18.100**	1.711**	4.525**	12.352**	10.498	9.223**	3.077	502	0*
4	4,5*	5,77	9*	12,6	30*	38,6	3.900*	11.300	156	565	1.716*	6.328	2.028	4.294	0*	113*
5	4,67*	5,1*	10,5*	10,67*	33,3*	37,1	11.800	6.564	1.534**	1.298**	4.366	2.276*	5.664**	5.401**	236	218
6	5,6	5,8	12,5	12,9	37,1	38,5	12.700	15.298	1.016	874	4.572	3.468	6.604**	9.244**	508	461
7	5,8	5,7	15,2	15	38,8	38,1	16.700	18.000**	501	753	6.012	8.032	9.686**	7.453**	501	552
8	4,39*	5,6	9,6*	12,1	32,3*	38,2	14.200	14.200	426	426	7.952	7.952	5.396**	4.396	284	284
9	5,23*	5,5	12,1	13,1	36,7*	37,56	13.000	11.000	650	492	8.320	11.143	4.030	4.670	0*	0*
10	4,2*	5,3*	10,2*	12,2	32,8*	37,8	19.800**	16.540	396	466	11.286	6.545	7.920**	5.498**	198	187

Tabela 11. Resultado do hemograma completo de cães com leishmaniose visceral antes e após terapia com Miltefosina.

AT: Antes do tratamento. DT: Depois do tratamento.

*Abaixo dos níveis de referência. **Acima dos níveis de referência.

Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

Animais	Plaquetas (200.000-900.000 10 ⁵ /mm ³)	
	AT	DT
1	243.000	152.000*
2	249.000	216.000
3	190.000*	216.800
4	231.000	285.000
5	350.000	321.000
6	355.000	298.000
7	284.000	264.000
8	380.000	322.000
9	489.000	344.000
10	316.000	309.000

Tabela 12. Resultado de perfil plaquetário de cães com leishmaniose visceral antes e após terapia com Miltefosina.

AT: Antes do tratamento. DT: Depois do tratamento.

*Abaixo dos níveis de referência. **Acima dos níveis de referência.

Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

BIOQUÍMICOS

Animal	Ureia (21,4 - 59,92 g/dL)		Creatinina (0,5 - 1,5 mg/dL)		AST (21 - 45 U/L)		ALT (21 - 86 U/L)		Fosfatase Alcalina (20 - 156 U/L)		Proteínas totais (5,4 - 7,7 g/dL)		Albumina (2,3 - 3,8 g/dL)		Globulina (2,3 - 5,2 g/dL)	
	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT
1	41	44	1,1	1,1	31	26	41,9	31	129	98	7,8**	7,9**	2,2*	2,3	5,6**	5,6**
2	25	27	0,7	0,8	57**	131**	62	47	71	57	6	6,2	2,4	2,4	3,6	3,8
3	41,5	30	1	0,8	87**	78,5**	77	73	142	120	6,9	6,3	2,8	3,1	4,1	3,2
4	54	30	0,5	0,7	131**	104**	31	84	146	112	8,7**	8,6**	2,2*	2,2*	6,5**	6,4**
5	41,1	36,4	0,6	0,6	47**	43	39	41	23	26	7,6	7,6	3,2	3,6	4,4	4
6	42,3	57	0,9	0,6	34	39	43	38	90	27	6,8	5,9	1,7	3,1	5,1	2,8
7	42,1	37,4	1,3	1,1	47**	38	59	42	121	114	7,9**	7,7	1,8*	2,4	6,1**	5,3
8	38,1	29	1,4	1	47,9**	38,2	53	51,9	35	21	8,2**	7,3	2,2*	2,4	6**	4,9
9	32	24,9	0,7	0,4*	22	28	27	32	42	29	6,8	6,1	2,9	2,5	3,9	3,6
10	22,6	25,3	0,5	0,6	43	35	49	39	43	21	6,67	8,2**	2,4	1,7*	4,2	6,5**

Tabela 13. Resultado dos testes bioquímicos séricos para avaliação das funções renal e hepática de cães com leishmaniose visceral antes e após terapia com Miltefosina.

AT: Antes do tratamento. DT: Depois do tratamento.

*Abaixo dos níveis de referência. **Acima dos níveis de referência.

Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

ERITROGRAMA							LEUCOGRAMA									
Animais	Eritrócitos (5,5-8,5 10 ⁶ /mm ³)		Hemoglobina (12-18 g%)		Hematócrito (37-55%)		Leucócitos (6.000 - 17.000 10 ³ /mm ³)		Eosinófilos (100-1.250)		Segmentados (3.000-11.500)		Linfócitos (1.000-4.800)		Monócitos (150-1.350)	
	AV	DV	AV	DV	AV	DV	AV	DV	AV	DV	AV	DV	AV	DV	AV	DV
1	5,8	5,6	13,4	13,6	38,1	38,9	9.850	10.112	670	820	4.240	4.927	1.345	3.545	192	219
2	6,1	6,7	16,9	17,1	42	44,1	15.984	16.482	354	410	9.420	9.012	4.210	6.234*	290	312
3	6,25	6,9	17,3	17,8	43,6	47,6	12.300	11.139	1.123	1.021	11.012	10.923	6.913	8.372*	320	287
4	5,79	6,1	16	16,5	42,2	51,2	8.800	11.300	240	310	3.744	3.123	1.016	2.112	154	154
5	6,9	7,4	17,24	17,93	46,8	48,7	12.134	12.981	469	413	11.132	11.825	1.062	1.198	256	419
6	5,55	5,59	16,4	12,3	37,1	37,8	11.800	11.800	354	118	8.260	5.428	2.950	5.900*	236	354
7	5,6	5,9	13,6	14,12	37,4	37,9	15.500	14.990	1.240	834	8.990	7.424	2.270	2.872	209	321
8	5,95	6,23	13,12	16,4	39,1	42	16.460	16.924	230	283	9.639	7.340	3.122	4.752	197	173
9	6	6,8	14,98	15,8	40,3	41,3	11.121	13.132	311	410	7.233	8.101	1.345	1.426	410	383
10	6,2	6,05	14,2	13	36,8	37,2	10.243	8.700	267	261	5.786	3.654	4.398	4.350	254	435

Tabela 14. Resultado do hemograma completo de cães sadios antes e após vacinação com Leish-Tec®.

AV: Antes da vacinação. DV: Depois da vacinação.

*Abaixo dos níveis de referência. **Acima dos níveis de referência.

Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

Animais	Plaquetas (200.000-900.000)		Proteína Plasmática (6-8 g/dL)	
	AV	DV	AV	DV
1	298.000	296.000	6	6,8
2	256.000	273.000	7	7,3
3	245.000	257.000	7,8	7,9
4	218.000	208.000	7,8	7,8
5	218.000	201.000	7,2	7,1
6	337.000	332.000	6,8	6
7	297.000	310.000	6,8	7,2
8	231.000	255.000	6,9	7,4
9	311.000	301.000	7,4	7,5
10	299.000	244.000	6,6	6,8

Tabela 15. Resultado de perfil plaquetário de cães saudáveis antes e após vacinação com Leish-Tec®.

AV: Antes da vacinação. DV: Depois da vacinação

*Abaixo dos níveis de referência. **Acima dos níveis de referência.

Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

BIOQUÍMICO

Animal	Ureia (21,4 - 59,92 g/dL)		Creatinina (0,5 - 1,5 mg/dL)		AST (8,9 - 48,5 UI/L)		ALT (21 - 86 UI/L)		Fosfatase Alcalina (20 - 156 UI/L)	
	AV	DV	AV	DV	AV	DV	AV	DV	AV	DV
1	29,1	30,2	0,9	0,7	42	44,3	24,4	28,1	48	55
2	34,8	39,4	1,2	1,3	39,1	41,3	41,2	39	69	43
3	39	42	1,4	1,2	32,9	30,1	33	36,7	37	41
4	40	44,8	0,6	0,9	42,1	39,2	29	32,9	132	113
5	28	31,9	0,8	1	36	33,4	26	25,4	61	82
6	37	31	1	0,9	36	38	31	42	73	74
7	28,3	26,3	1,1	1,3	35,8	35	29,3	30	141	137
8	32	29,4	1,5	1,3	28,4	32,4	32,9	34,5	98	82
9	21	26	0,5	0,8	39	46,1	42	44	72	67
10	34,8	38,5	0,8	0,5	32,5	41	43,1	36	83	69

Tabela 16. Resultado dos testes bioquímicos séricos para avaliação das funções renal e hepática de cães com leishmaniose visceral antes e após vacinação com Leish-Tec®.

AV: Antes da vacinação. DV: Depois da vacinação

. *Abaixo dos níveis de referência. **Acima dos níveis de referência.

Valores de referência segundo SCHALM'S, Veterinary hematology (2010).

ANIMAIS ASSINTOMÁTICOS

Nome do Animal:

Nº do animal:

Raça:

Idade:

Sexo:

Proprietário:

Tel:

Endereço:

Castrado? SIM NÃO Vermifugado? SIM NÃO Data da última vermifugação:

Alimentação: Ração Comida caseira AN

Outros? Quais? _____

Vacinação? Quais? _____

Procedimento cirúrgico recentemente? _____

Presença de sinais clínicos? SIM NÃO

Quais?

DATA DA COLETA:**OBSERVAÇÕES:**

ANIMAIS SINTOMÁTICOS

Nome do Animal:

Nº do animal:

Raça:

Idade:

Sexo:

Proprietário:

Tel:

Endereço:

Castrado? SIM NÃO Vermifugado? SIM NÃO Data da última vermifugação:

Alimentação: Ração Comida caseira AN

Outros? Quais? _____

Vacinação? Quais? _____

Procedimento cirúrgico recentemente? _____

DATA DA COLETA:**OBSERVAÇÕES:****EXAMES REALIZADOS:** Hemograma Completo Creatinina Punção de linfonodo Pesquisa de Babesia AST DPP® Pesquisa de Ehrlichia ALT Elisa indireto Ureia Proteínas totais e frações Proteínas totais e frações Punção Medular RIFI FA

Outros: _____

TRATAMENTO

Nome do Animal:

Nº do animal:

Raça:

Idade:

Sexo:

Proprietário:

Tel:

Endereço:

Castrado? SIM NÃO Vermifugado? SIM NÃO Data da última vermifugação:

Alimentação: Ração Comida caseira AN

Outros? Quais? _____

Vacinação? Quais? _____

Procedimento cirúrgico recentemente? _____

Início do tratamento:

Término do tratamento:

Presença de sinais clínicos?

SIM NÃO

Quais?

❖ DATA DAS COLETAS

1ª Antes do tratamento:

2ª Após o tratamento:

3ª Após o tratamento:

OBSERVAÇÕES (ANTES DO TRATAMENTO):

EXAMES REALIZADOS ANTES DO TRATAMENTO:

- | | | |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> Hemograma Completo | <input type="checkbox"/> Creatinina | <input type="checkbox"/> Punção de linfonodo |
| <input type="checkbox"/> Pesquisa de Babesia | <input type="checkbox"/> AST | <input type="checkbox"/> DPP® |
| <input type="checkbox"/> Pesquisa de Ehrlichia | <input type="checkbox"/> ALT | <input type="checkbox"/> Elisa indireto |
| <input type="checkbox"/> Ureia | <input type="checkbox"/> Proteínas totais e frações | |
| <input type="checkbox"/> Proteínas totais e frações | <input type="checkbox"/> Punção Medular | <input type="checkbox"/> RIFI |
| <input type="checkbox"/> FA | | |

Outros: _____

OBSERVAÇÕES DURANTE O TRATAMENTO:**EXAMES REALIZADOS APÓS O TRATAMENTO:**

- | | | |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> Hemograma Completo | <input type="checkbox"/> Creatinina | <input type="checkbox"/> Punção de linfonodo |
| <input type="checkbox"/> Pesquisa de Babesia | <input type="checkbox"/> AST | <input type="checkbox"/> DPP® |
| <input type="checkbox"/> Pesquisa de Ehrlichia | <input type="checkbox"/> ALT | <input type="checkbox"/> Elisa indireto |
| <input type="checkbox"/> Ureia | <input type="checkbox"/> Proteínas totais e frações | |
| <input type="checkbox"/> Proteínas totais e frações | <input type="checkbox"/> Punção Medular | <input type="checkbox"/> RIFI |
| <input type="checkbox"/> FA | | |

Outros: _____

OBSERVAÇÕES APÓS O TRATAMENTO:

VACINAÇÃO

Nome do Animal:

Nº do animal:

Raça:

Idade:

Sexo:

Proprietário:

Tel:

Endereço:

Castrado? SIM NÃO Vermifugado? SIM NÃO Data da última vermifugação:

Alimentação: Ração Comida caseira AN

Outros? Quais? _____

Vacinação? Quais? _____

Procedimento cirúrgico recentemente? _____

❖ DATA DAS COLETAS

- Data da realização do teste anti-leishmaniose:

- Data da 1ª Coleta antes do início da vacina:

EXAMES REALIZADOS ANTES DAS VACINAS:

 Hemograma Completo Creatinina Punção de linfonodo

 Pesquisa de Babesia AST DPP®

 Pesquisa de Ehrlichia ALT Elisa indireto

 Ureia Proteínas totais e frações

 Proteínas totais e frações Punção Medular RIFI

 FA

Outros: _____

- Data da 2ª Coleta após a administração das vacinas:

EXAMES REALIZADOS APÓS VACINAS:

- | | | |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> Hemograma Completo | <input type="checkbox"/> Creatinina | <input type="checkbox"/> Punção de linfonodo |
| <input type="checkbox"/> Pesquisa de Babesia | <input type="checkbox"/> AST | <input type="checkbox"/> DPP® |
| <input type="checkbox"/> Pesquisa de Ehrlichia | <input type="checkbox"/> ALT | <input type="checkbox"/> Elisa indireto |
| <input type="checkbox"/> Ureia | <input type="checkbox"/> Proteínas totais e frações | |
| <input type="checkbox"/> Proteínas totais e frações | <input type="checkbox"/> Punção Medular | <input type="checkbox"/> RIFI |
| <input type="checkbox"/> FA | | |

Outros: _____

❖ DATA DAS VACINAÇÕES

- 1ª Dose da Leish tec:

- 2ª Dose da Leish tec:

- 3ª Dose da Leish tec:

OBSERVAÇÕES:

FICHA DE AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE MATERIAL

Eu, _____,
CPF n° _____, residente em

tutora do animal _____, sexo _____, idade _____, raça
_____, autorizo a participação do meu animal como objeto de estudo no projeto de
mestrado intitulado “Perfil de imunoglobulinas envolvidas na leishmaniose visceral
canina: vacinação, infecção e tratamento”, realização de coleta de material (sangue total,
punção medular e/ou linfonodo) pela Mestranda Lucélia Teixeira França para realização
de exames laboratoriais como Hemograma completo, bioquímicos (ureia, creatinina,
AST, ALT, FA, Proteínas totais e frações), teste parasitológico (esfregaço de medula) e
sorológicos (teste imunocromatográfico rápido DPP®, ELISA indireto e RIFI) para
confirmação ou exclusão do diagnóstico de leishmaniose visceral canina e dosagem de
Imunoglobulinas.

São Luís, de _____ de 2018.

(Assinatura do tutor)



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**

Centro de Ciências Agrárias
Curso de Medicina Veterinária
Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA)
Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT
Processo 01200.002200/2015-06 (449) - Emissão 19/06/2015

DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado **“PERFIL DE IMUNOGLOBULINAS ENVOLVIDAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: VACINAÇÃO, INFECÇÃO E TRATAMENTO”** foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal - CEEA do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, conforme protocolo nº 28/2017 aprovado em 03/03/2018, para o período de execução da pesquisa até 2018 pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo, o membro executor Lucélia Teixeira França e o colaborador Carla Janaina Rebouças Marques do Rosário por atender as normas de Bem-Estar Animal da Resolução do CFMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008.

São Luís, 05 de março de 2018

Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA



**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT
Processo 01200.002200/2015-06 - 19/06/2015

PARECER DE APROVAÇÃO

DATA DA ENTRADA DO PROTOCOLO	NÚMERO DO PROTOCOLO	DATA DA APROVAÇÃO
21/ 06/ 2017	28/2017	03/ 03/ 2018

TÍTULO DO PROJETO

PERFIL DE IMUNOGLOBULINAS ENVOLVIDAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: VACINAÇÃO, INFECÇÃO E TRATAMENTO

LOCAL DA EXECUÇÃO (IES/Laboratório)

Departamento de Patologia Clínica

OBJETIVO

Avaliar a produção de imunoglobulinas envolvidas na leishmaniose visceral em cães vacinados, naturalmente infectados e submetidos à tratamento

ESPÉCIE ANIMAL/RAÇA

Cão

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA AUTORIZADA

50 animais divididos em 5 grupos (10 animais/ grupo)

PERÍODO DE EXECUÇÃO DA PESQUISA

03/2017 a 12/2018

PESQUISADOR RESPONSÁVEL/EXECUTOR

Lucélia Teixeira França (Orientador: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo)

EQUIPE/COLABORADORES

Carla Janaina Rebouças Marques do Rosário

05 / 03 / 2018

Alana

Presidente da Comissão

Prof. Dr. Alana Lúcia de Sousa
MV / UEMA / 9357