



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA
NOS TRÓPICOS

SHAMMARA NOLETO SANTOS

**MILTEFOSINA NO TRATAMENTO DE CÃES COM LEISHMANIOSE: EFEITOS
HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

ARAGUAÍNA (TO)

2018

SHAMMARA NOLETO SANTOS

**MILTEFOSINA NO TRATAMENTO DE CÃES COM LEISHMANIOSE: EFEITOS
HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins, como requisito final à obtenção do grau de mestre em Morfologia, Clínica e Cirurgia Animal.

Orientadora: Dra. Ana Paula Coelho Ribeiro

ARAGUAÍNA (TO)

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S237m Santos, Shammara Noleto .

Miltefosina no tratamento de cães com leishmaniose: efeitos hematológicos e bioquímicos. / Shammara Noleto Santos. – Araguaína, TO, 2018.

56 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2018.

Orientadora : Ana Paula Coelho Ribeiro

1. Leishmania. 2. Leishmanicida. 3. Milteforan. 4. Perfil. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

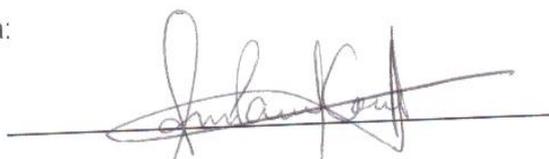
SHAMMARA NOLETO SANTOS

**MILTEFOSINA NO TRATAMENTO DE CÃES COM LEISHMANIOSE: EFEITOS
HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins, foi avaliada para a obtenção do título de mestre em Morfologia, Clínica e Cirurgia Animal, e aprovada em sua forma final pela Orientadora e pela Banca examinadora.

Aprovado em: 07/03/18.

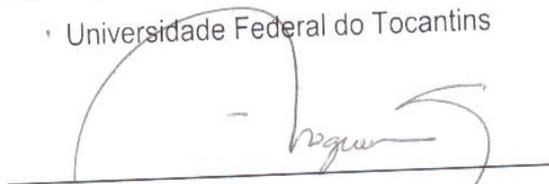
Banca examinadora:



Dra. Ana Paula Coelho Ribeiro (Orientadora)
Universidade Federal do Tocantins



Dra. Katyane de Sousa Almeida (Examinadora)
Universidade Federal do Tocantins



Dra. Andressa Francisca S. Nogueira (Examinadora)
Universidade Federal do Tocantins

Dedico esse trabalho a Deus, meu guia, meu tudo. Aos meus pais e toda minha família que sempre me incentivou ao máximo para que eu pudesse dar mais esse passo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura A - Morfologia da <i>Leishmania</i> sp promastigota.....	13
Figura B - Morfologia da <i>Leishmania</i> sp amastigota	13
Figura C - Desenho esquemático dos morfotipos de <i>Leishmania</i>	14
Figura D - Estrutura molecular da Miltefosina.....	22
Gráfico 1 – Representação dos valores de hematócrito nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias.....	42
Gráfico 2 – Representação dos valores das plaquetas nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias.....	43
Gráfico 3 – Representação dos valores das AST nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias.....	46
Gráfico 4 – Representação dos valores da albumina nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias.....	48
Gráfico 5 – Representação dos valores das globulinas nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias.....	50
Gráfico 6 – Representação dos valores da relação A/G nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais valores hematimétricos absolutos dos cães do G1 (com Leishmaniose) em dois momentos (M1 e M2) e do G2 (sem Leishmaniose)41

Tabela 2 - Principais valores bioquímicos dos cães do G1 (com Leishmaniose) em dois momentos (M1 e M2)45

LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanino aminotransferase
ANCLIVEPA	Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais
AST	Aspartato aminotransferase
BID	Duas vezes ao dia
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FC	Fixação de Complemento
IFI	Imunofluorescência Indireta
IGg	Imunoglobulina G
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MT	Miltefosina
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PCR	Reação de Cadeia em Polimerase
PT	Proteínas Totais
SESAU	Secretaria Estadual da Saúde
SID	Uma vez ao dia
UFMT	Universidade Federal do Mato Grosso
UFT	Universidade Federal do Tocantins
VO	Via Oral

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1 A LEISHMANIOSE	10
1.1 Leishmaniose Visceral	11
1.2 Leishmaniose Cutânea	12
1.3 Ciclo da doença	13
1.4 O vetor	15
1.5 Hospedeiros e Reservatórios	16
1.6 Ciclo de Transmissão	18
1.7 Sinais clínicos no cão	18
1.8 Diagnóstico	20
1.9 Tratamento	20
2 MILTEFOSINA	21
2.1 Mecanismo de ação	22
2.2 Farmacocinética	23
2.3 Vantagens	23
2.4 Precauções e cuidados	23
2.5 Efeitos adversos	23
2.6 Excreção	24
2.7 Dosagem	24
3 MEDIDAS PREVENTIVAS	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

CAPÍTULO II

MILTEFOSINA NO TRATAMENTO DE CÃES COM LEISHMANIOSE: EFEITOS

HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

RESUMO	34
ABSTRACT	351
INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1 Aprovação do Comitê de Ética (CEUA)	37
2.2 Local	38
2.3 Animais	38
2.4 Triagem para composição dos grupos experimentais	38
2.4.1 Exame Parasitológico.....	38
2.4.2 Diagnóstico Sorológico e Molecular (PCR)	38
2.5 Exames hematológicos	39
2.6 Exames bioquímicos	39
2.7 Tratamento com Miltefosina	39
2.8 Coleta de dados	39
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Avaliação hematológica	40
4.2 Avaliação bioquímico sérica	45
4.3 Avaliação das proteínas totais e frações	47
4.4 Avaliação da relação albumina/globulinas	50
5 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1 A LEISHMANIOSE

As leishmanioses são doenças endêmicas e constituem enfermidades zoonóticas, com ampla distribuição mundial e são transmitidas, principalmente, pela forma vetorial a partir da picada do vetor, principalmente *Lutzomyia longipalpis*. Nas Américas, a enfermidade possui como agente causador o protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, de ciclo digenético (OMS, 2015).

É considerada uma doença negligenciada e chega a afetar milhões de pessoas ao redor do mundo, principalmente indivíduos carentes e residentes em países em desenvolvimento, como o Brasil (OMS, 2015). Existem cerca de 12 a 15 milhões de indivíduos infectados com *Leishmania* spp. (BRASIL, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose pode se manifestar nas formas cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV), sendo esta última popularmente conhecido como calazar (OMS, 2015). Os agentes etiológicos dessa doença são protozoários do gênero *Leishmania*, que pertencem à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (DAWIT; GIRMA; SIMENEW, 2013).

A incidência anual da leishmaniose no mundo é de 0,7 a 1,2 milhões de casos de LC e 0,2 a 0,4 milhões de casos de LV, e o número de óbitos entre 20 a 30 mil pessoas por ano (OMS, 2015). No Brasil, a maior incidência de casos de LV ocorre na região nordeste do país (BRASIL, 2013).

Os caninos domésticos são os principais reservatórios urbanos da enfermidade nas Américas, pois estão em contato direto com os seres humanos, e ainda, apresentam intenso parasitismo na pele (BRANDÃO - FILHO; DANTAS-TORRES, 2006). A Similaridade entre a evolução da leishmaniose e o desenvolvimento sistêmico da doença faz dos caninos um bom modelo experimental para a doença em seres humanos (ALVES et al., 2010).

A leishmaniose é uma doença de grande relevância na saúde pública pela alta taxa de mortalidade, principalmente em idosos, pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em crianças desnutridas e está em alta expansão geográfica (CRAFT; EZRA; OCHOA, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda para fins de controle da doença, a saber: diagnóstico e tratamento precoce de pacientes humanos, combate ao vetor biológico e identificação e eutanásia de reservatórios caninos infectados. Dentro desse contexto, milhares de cães soro reagentes (positivos) são eliminados todos os anos no Brasil (COSTA, 2011).

1.1 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é transmitida no Brasil por meio de dípteros da espécie *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi* que ao sugar o sangue de um indivíduo infectado, inocula o parasito em sua corrente sanguínea (GONTIJO; MELO, 2012).

O Brasil é responsável por 90% dos casos de LV da América Latina (SHAW, 2003). E somando-se a Índia, Etiópia, Sudão, Nepal e Bangladesh, correspondem há mais de 90% da incidência anual de LV no mundo (OMS, 2015).

Mais de 50.000 óbitos acontecem todos os anos devido à gravidade da LV (OMS, 2015), ocupando assim, o segundo lugar, ficando atrás apenas da malária, dentro do ranking de mortalidade causada por enfermidades parasitárias (EZZATI; LOPEZ; MATHERS, 2007).

A LV ou calazar, é resultante da infecção por *L. donovani* e *L. infantum*. No Brasil, a forma visceral é associada ao parasito *L. infantum*, conhecido como *L. chagasi* ou *L. infantum chagasi* (DIRO; VAN GRIENSVEN, 2012). A LV tem se expandido do ambiente rural em direção às áreas urbanas, mais frequente em crianças menores de dez anos (BRASIL, 2013).

Os fatores que auxiliam no surgimento da LV podem ser divididos em fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro. Entre os fatores relacionados ao hospedeiro: a capacidade do mesmo em desenvolver resposta imune eficaz contra o parasito, evolução, genética, estado nutricional entre outros (ENGWERDA; STANLEY 2007). Os fatores relacionados ao parasito incluem: a carga parasitária e características genéticas do parasito (MAIA; CAMPINO, 2008; MATLASHEWSKI; ZHANG, 2010).

A evolução e o desenvolvimento sistêmico da LV apresentam similaridades entre as espécies canina e humana. A doença promove manifestações clínicas variáveis e inespecíficas dependendo da resposta imunológica individual e do sistema acometido (GODOY, 2015).

A LV é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para os humanos, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado, sendo considerada a principal forma da doença causada no Brasil (GONTIJO; MELO, 2012).

1.2 Leishmaniose Cutânea

Já a LC pode ser causada por várias espécies dermatrópicas de leishmânias, que são divididas em espécies do Velho Mundo, tais como: *L. tropica* e *L. major* e espécies do Novo Mundo, tais como: *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. naiffi*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (REEDIJK; SCHALLIG; VRIES, 2015).

De acordo com o parasito infectante, a LC pode assumir três manifestações clínicas diferentes: a leishmaniose cutânea localizada (LCL), essa forma clínica é mais frequentemente associada aos parasitos *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo, enquanto no Novo Mundo, associa-se à *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013).

A lesão característica dessa enfermidade é geralmente, indolor, única, e se localiza em áreas mais expostas da pele, de formato arredondado de base infiltrada e fundo avermelhado e granuloso (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013). Esse tipo de lesão tende à cura espontânea, sendo, no Brasil, mais frequentemente associada à infecção por *L. braziliensis* (BRASIL, 2013).

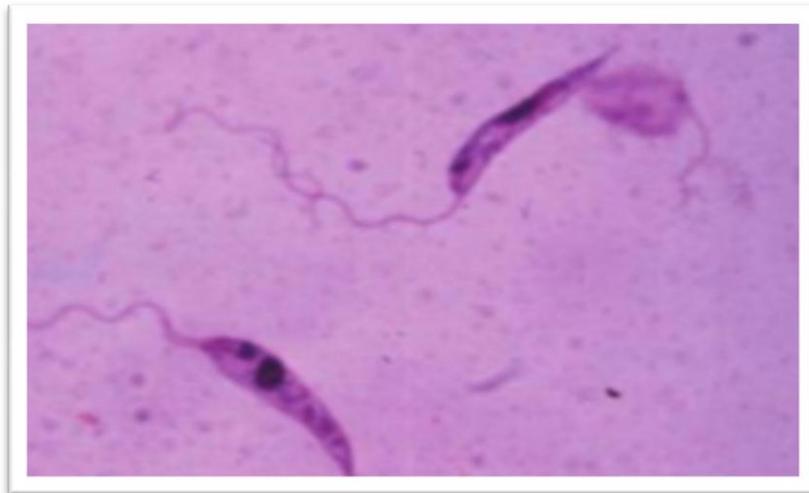
Já a leishmaniose cutânea difusa (LCD) se caracteriza por lesões do tipo nodulares não ulceradas na pele. Depois da lesão primária inicial, ocorre disseminação das lesões para outras áreas da pele, possivelmente, pela disseminação do parasito por via linfática ou hematogênica e por falha na ativação da resposta imune celular (BRASIL, 2013; CHOI; LERNER, 2001).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) pode se desenvolver anos após a cura clínica da lesão cutânea ou a partir da picada de flebotomíneos infectados com *L. braziliensis* em indivíduos que não tenha histórico de lesão cutânea prévia. Tem por característica o envolvimento das membranas e mucosas devido à disseminação hematogênica e linfática do parasito ou por extensão direta de lesões cutâneas nas proximidades dessas mucosas (CHOI; LERNER, 2001).

1.3 Ciclo da doença

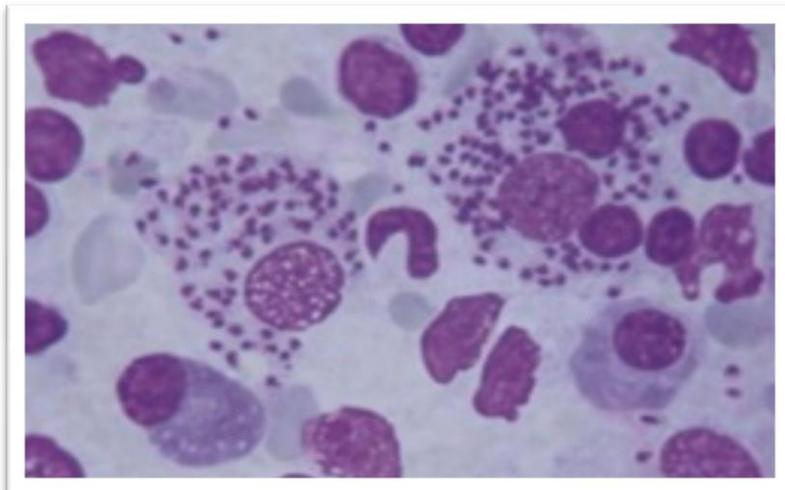
O ciclo da *Leishmania* spp. envolve dois hospedeiros diferentes: a fêmea do flebotomíneo infectada e um mamífero vertebrado (TEIXEIRA, 2013). Possuem um ciclo heteroxênico, alternando entre formas extracelulares flageladas, promastigotas (Figura A), que podem ser encontradas no intestino do inseto vetor e formas intracelulares, sem flagelo, amastigotas (Figura B), que se multiplicam dentro de macrófagos ou células dendríticas do hospedeiro vertebrado (NIETO, 2011).

Figura A: Morfologia da *Leishmania* sp promastigota.



Fonte: (Solano Gallego; Baneth, 2012)

Figura B: Morfologia da *Leishmania* sp amastigota.



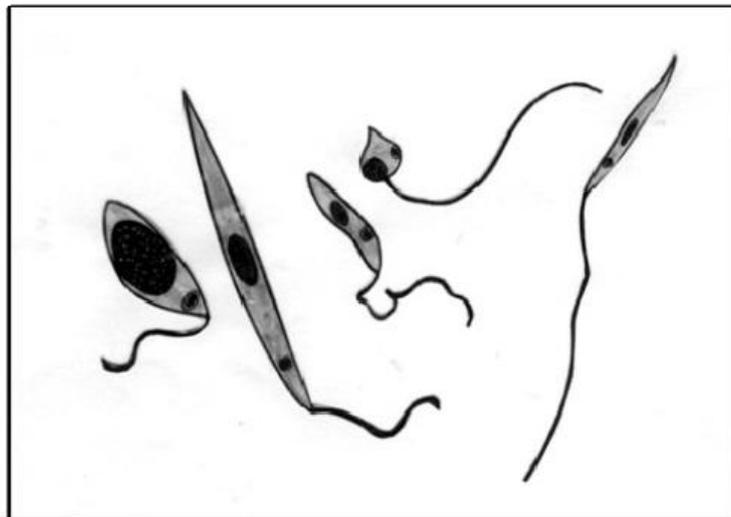
Fonte: (Solano Gallego et al., 2009)

No repasto sanguíneo, a fêmea do vetor ingere as formas amastigotas que estão nos macrófagos da pele do hospedeiro vertebrado infectado. Os vetores possuem peças bucais curtas e realizam hematofagia e sua probóscide penetra na pele do hospedeiro lacerando capilares e cortando os tecidos e assim, se alimentam do sangue que se acumula em poços (ANDRADE, 2007).

Os danos teciduais gerados por esse tipo de alimentação, permitem a liberação de macrófagos e das formas amastigotas dos tecidos para o sangue, possibilitando a infecção do vetor no momento do repasto. Para que ocorra o desenvolvimento do parasito dentro do vetor, acontecem modificações daquele até a chegada no interior do intestino do vetor (DOSTÁLOVÁ; VOLFF, 2012).

As formas amastigotas alteram-se para promastigotas procíclicas, com flagelos externos, e replicam por divisão binária simples. Após alguns dias a replicação diminui e os parasitos mudam para uma forma alongada e de grande mobilidade, os promastigotas nectomonas (Figura C) (DOSTÁLOVÁ; VOLFF, 2012).

Figura C: Desenho esquemático dos morfotipos de *Leishmania*, da esquerda pra direita: promastigota procíclica, promastigota nectomona, promastigota haptomona, promastigota paramastigota e promastigota metacíclica.



Fonte: Lawer e colaboradores (1990) (Desenho de Paulo Pimenta).

Logo em seguida, os parasitos são liberados no epitélio do intestino do inseto e se dividindo por divisão binária, logo se aderem as microvilosidades presentes no intestino. Essas formas movem-se para a porção anterior do intestino, quando atingem a válvula estomodeal os promastigotas nectomonas transformam-se em

promastigotas leptomonas, formas que são mais curtas e continuam a replicação (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

Por fim, os parasitos se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas, que são infectantes para os hospedeiros vertebrados quando inoculadas na pele e são fagocitadas por neutrófilos causando a apoptose dessas células (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; PETERS; SACKS, 2009; TEIXEIRA, 2013).

Na interação da célula com o hospedeiro ocorre a internalização do parasito em um vacúolo (parasitóforo) onde ele se diferencia na forma amastigota. Logo após a fusão do vacúolo com o lisossomo, inicia-se o processo de replicação. Com o rompimento da célula hospedeira, há uma liberação de parasitos que podem infectar novas células e assim iniciar um novo ciclo de replicação (TEIXEIRA, 2013).

A lesão causada por espécies dermatrópicas permanece na pele e, quando se trata de parasitos viscerotrópicos, as lesões serão encontradas em vários órgãos como: fígado, rim, medula óssea e baço. O ciclo recomeça com um novo repasto sanguíneo (PONTE SUCRE, 2003).

1.4 O vetor

Existem cerca de mais de 400 espécies de *Lutzomyia* descritas, porém a grande maioria delas sem importância na epidemiologia das leishmanioses. Das espécies descritas, apenas 44 são vetores conhecidos ou suspeitos de transmitir *Leishmania* para o homem (DUNCAN; YOUNG, 1994).

A Leishmaniose Visceral (LV) é transmitida no Brasil pelo inseto fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis* comumente conhecido como “flebotomo” (CHAVES, 1996; MIRANDA, 2008). No Brasil, duas espécies de vetores, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo a primeira a principal espécie transmissora, enquanto que a segunda foi encontrada somente no estado do Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2013).

Os flebotomíneos são insetos pertencentes a ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (READY, 2013). São de pequeno porte, apresentam vôo em pequenos saltos, coloração clara, intensa pilosidade e tem atividade noturna e crepuscular (BRASIL, 2014).

Os reservatórios são infectados a partir da picada das fêmeas dos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo (CAMARGO et al, 2007; FEITOSA et al., 2000). Os que se alimentam em diferentes espécie animais, porém, os canídeos

silvestres (raposas e marsupiais) e os cães domésticos são os principais reservatórios do parasito. O flebotomíneo está bem adaptado ao ambiente peridomiciliar e se alimenta de uma variedade de hospedeiros como galinhas, suínos, gatos, bovinos, equinos, macacos, entre outros (BARATA et al., 2005).

O vetor desenvolve se na sua fase larval em solo úmido rico em matéria orgânica. O acúmulo de matéria orgânica gerada pelos animais domésticos, ligadas as más condições sanitárias e locais com pouca incidência luminosa são adequados para o desenvolvimento da fase larvar. Já na fase adulta, abrigam se nos mesmos locais do criadouro, porém somente as fêmeas são hematófagas obrigatórias (FELIPE et al., 2011).

Há indícios de que o período de maior transmissão ocorra durante e logo após a fase chuvosa, pois ocorre um aumento considerável na densidade populacional do inseto. O hábito do vetor costuma ser vespertino e noturno, ficando em repouso no período matutino em lugares sombreados e úmidos e que estejam protegidos do vento e de predadores naturais, como o intra e peridomicílio (BARATA et al., 2005; LAISON; RANGEL, 2007; MAIA- ELKHOURY et al., 2008).

O flebotomíneo *L longipalpis* é um vetor de grande importância nos ambientes urbanos e tem seu papel central do processo de transmissão da doença e sua ampla distribuição no país (MORAES CORREIA et al., 2007). Dessa forma, muito se tem buscado a respeito do desenvolvimento de novas ferramentas que auxiliem no controle e prevenção da infecção do vetor pelo parasito (OLIVEIRA, 2016).

1.5 Hospedeiros e Reservatórios

Os hospedeiros vertebrados da *Leishmania* spp são mamíferos pertencentes a sete ordens distintas: Didelphimorphia (marsupiais), Pilosa (tamanduás e preguiças), Cingulata (tatus), Rodentia (roedores), Primata (macacos e humanos), Carnivora (cães e gatos principalmente) e Chiroptera (morcegos) (JANSEN; ROQUE, 2014).

Seres humanos e outras várias espécies de animais são considerados como hospedeiros naturais de *Leishmania* spp. Os hospedeiros invertebrados são chamados vetores, são insetos de diversas espécies de flebotomíneos (OMS, 2015; REY, 2001)

De forma geral, o cão (*Canis familiaris*) desempenha o papel mais importante na transmissão urbana de *L. infantum chagasi* para o homem, permanecendo os demais canídeos responsáveis pela manutenção, principalmente, do ciclo silvestre do parasito (ALVAR et al., 2004).

Já no ambiente silvestre, as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) são reservatórios da *Leishmania spp.* No Brasil, as raposas são encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica. Os marsupiais didelfídeos foram encontrados infectados no Brasil (Brasil, 2006). São capazes de transportar o protozoário do ecótopo silvestre/doméstico, e assim amplificarem a cadeia de transmissão em espaços intra urbanos (WERNECK, 2008).

A epidemiologia da doença depende da tríade formada pelo homem, vetor e reservatório (MELO, 2004). A infecção canina geralmente precede o aparecimento de casos humanos sendo mais prevalente que a doença humana. Em âmbito doméstico, a maioria dos cães com sorologia positiva não apresenta sinais clínicos (assintomáticos), atuando, no entanto, como reservatórios e podendo servir de fonte de infecção para os flebotomíneos (ALVAR; MORENO, 2002).

Um estudo sobre a dinâmica de transmissão da LV enfatizou duas variáveis a serem consideradas dentro dos programas de controle, a sazonalidade da variação da população de flebotomíneos e a quantidade de cães infectados (MONTEIRO et al., 2005).

É fundamental conhecer o tamanho da população canina para que assim, haja uma maior efetividade ao planejamento e a avaliação dos resultados de ações desencadeadas no sentido da proteção e preservação da saúde de animais e seres humanos. É necessário estabelecer relações entre o número de cães e os casos de doenças em humanos para, dar continuidade às ações dos programas de Vigilância Epidemiológicas (ALVES, 2005).

As ações de vigilância visam alertar os serviços e a classe médica veterinária quanto ao risco da transmissão da LVC, divulgar à população sobre a ocorrência da doença na região, os sinais clínicos e os serviços para o diagnóstico e medidas preventivas para eliminação dos prováveis criadouros do vetor (BRASIL, 2004).

Na área de investigação deverão ser desencadeadas a busca ativa de cães sintomáticos para coleta de exames. Após a confirmação da doença, coletar material para exame sorológico em todos os cães da área a fim de avaliar a prevalência canina e desencadear as demais medidas (BRASIL, 2004).

Em 2015, dos cães examinados no Tocantins, 7.765 apresentaram a doença. Segundo a Secretaria Estadual de Saúde (SESAU), foram diagnosticados 8.706 cães com calazar no estado do Tocantins no ano de 2016. As cidades de Palmas, Araguaína e Gurupi obtiveram os maiores números de casos sendo que os dados incluem os registros das clínicas particulares (SESAU, 2017).

Entre 2007 e 2014 foram diagnosticados 19.716 animais soropositivos durante os inquéritos sorológicos realizados em Araguaína. Observou-se uma ocorrência do maior número de cães infectados em 2009 com 2.644 animais reagentes. Em 2011 ocorreu a maior prevalência de infecção canina correspondendo a 54,5% (SESAU, 2017).

De acordo com os dados do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) em Araguaína no ano de 2016, foram 2.342 casos confirmados e em 2017, de janeiro a abril foram registrados 819 casos (ASCOM, 2016; SESAU, 2017).

1.6 Ciclo de transmissão

A transmissão vetorial pode acontecer de três maneiras: ciclo domiciliar – cão parasitado é a principal fonte para o vetor *L. longipalpis*, funcionando como reservatório e o vetor posteriormente infectará o homem; ciclo peridomiciliar – as raposas vão buscar alimentos, as galinhas mantem *L. longipalpis* no peridomicílio, o inseto se infecta ao se alimentar nas raposas e assim, transmite o protozoário no repasto sanguíneo no cão; ciclo silvestre – ocorre entre *L. longipalpis* e as raposas no Sudeste e Nordeste do Brasil, os cães e os homens se infectam ao penetrar neste ecótopo (REBÊLO, 1999).

Diversos fatores de risco estão envolvidos no curso do desenvolvimento da doença: desmatamentos, mudanças climáticas, transformações ambientais e urbanização podem gerar efeitos sobre os vetores, influenciando assim na sobrevivência do mosquito (OLIVEIRA, 2016; OMS, 2015).

Já os fatores sociais como condições socioeconômicas desfavoráveis, moradia, desnutrição e migração populacional também afetam diretamente os reservatórios e os humanos, contribuindo para a transmissão e infecção dos novos reservatórios e hospedeiros (OMS, 2015).

1.7 Sinais clínicos no cão

É uma síndrome clínica cuja apresentação varia desde formas assintomáticas a quadro clássico sintomático representado por anemia, febre, perda de peso, alopecia, linfadenomegalia, onicogrifose, tosse seca entre outros (FEITOSA et al., 2000; OLIVEIRA, 2016). Deve ser considerado suspeito de leishmaniose visceral todo indivíduo com febre e esplenomegalia, desde que descartado os diagnósticos diferenciais mais frequentes na região (BRASIL, 2014).

A doença grave se caracteriza por febre contínua e prolongada, hepatoesplenomegalia, perda de peso, palidez cutaneomucosa devido a pancitopenia e hipergamaglobulinemia. Evolui com comprometimento do estado geral, desnutrição, edema de membros inferiores, ascite, hemorragias e icterícia. O óbito, geralmente, decorre por infecções bacterianas e/ou sangramentos (ROCHA, 2015).

Lesões oculares como blefarites, edema de córnea, ceratoconjuntivite, formação de sinéquia e lesões em corpo ciliar e íris podem estar associado ao depósito de imunocomplexos nessas regiões, podendo ser corroborado pela presença de anticorpos específicos antileishmania em vários tecidos intra oculares, significando lesões de origem imunopatológica (CIARAMELLA et al., 2005).

No trato gastrointestinal pode ser observado melena e diarreia crônica, devido as ulcerações na mucosa intestinal e gástrica. Essas inflamações podem alcançar desde a mucosa até a muscular da submucosa. Colite ulcerativa e erosiva também podem estar presentes (LUVIZOTTO, 2006).

Os pulmões apresentam quadro de pneumonia intersticial crônica e difusa com infiltrado linfoplasmocitário (LUVIZOTTO, 2006). A LVC pode manifestar lesões osteoproliferativas de diáfises ósseas com sinais de atrofia muscular e osteolíticas (CIARAMELLA; CORONA, 2003).

No coração pode ocorrer miocardite multifocal com inflamação linfohistioplasmocitária acentuada, degeneração das fibras miocárdicas e necrose. A presença e envolvimento do parasito como sendo a causa de tais lesões já foi evidenciada por técnicas de imunomarcção (FERRARI et al., 2006).

A desordem imunológica pode originar doenças oportunistas concomitantes à LVC como cistites, pneumonias bacterianas, piodermites, demodicose, malasseziose, dermatofitoses e co-infecções com outros agentes, como babesia e dirofilária (LUVIZOTTO, 2006).

A infecção causada eleva a produção de imunocomplexos que ficam circulantes até se depositarem nos tecidos. A deposição dos imunocomplexos nos vasos sanguíneos causa as principais complicações da leishmaniose como vasculite, uveíte, glomerulonefrite e poliartrite (GREENE, 2006; NELSON; COUTO, 2006). As manifestações clínicas da LVC variam conforme o período de incubação, podendo ser de um mês a sete anos (COUTO; NELSON, 2006; GREENE, 2006; MIRÓ et al., 2008).

1.8 Diagnóstico

As técnicas utilizadas para o diagnóstico da doença compreendem exames parasitológicos, moleculares e imunológicos. Métodos parasitológicos incluem o esfregaço de medula óssea, aspirado de baço, fígado, linfonodos e o isolamento em cultura e/ou em animais susceptíveis. Estes não são considerados exames de eleição, pois a observação do parasito pode ser influenciada, por exemplo, pela prática de quem faz a leitura do material e a não observação do parasito não exclui a possibilidade do animal estar infectado (BRASIL, 2004). Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia de polimerase (PCR) constitui uma boa alternativa, permitindo identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito a partir de diferentes tecidos, incluindo medula óssea, aspirado de linfonodo, pele e sangue (FEITOSA; IKEDA-GARCIA, 2007).

Quanto aos exames imunológicos, destacam-se os testes sorológicos, que incluem as técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A IFI tem sido a mais utilizada pela alta sensibilidade (98-100%) e especificidade (80-100%), porém possui reação cruzada com agentes de outras doenças. O teste de ELISA é o mais utilizado para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral. É um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que o IFI. O teste é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (IKEDA-GARCIA et al., 2003).

1.9 Tratamento

Existe um número limitado de agentes farmacológicos utilizados no tratamento da LVC, entre eles, aminosidina, alopurinol, pentamidina, anfotericina,

antimoniais pentavalentes, espiamicina, domperidona, metronidazol e associações entre eles (OMS, 2015).

A miltefosina foi recentemente lançada para uso veterinário nos países do mediterrâneo. Apesar de o tratamento recuperar o animal clinicamente, com diminuição da carga parasitária e dos títulos de anticorpos circulantes observados na maioria dos cães tratados, porém, não garante que esses estejam livres da infecção (BRASIL, 2014; OMS, 2015).

Nos países da União Européia é comum o tratamento dos cães infectados como uma alternativa a contribuir no controle da LV pelo fato de reduzir significativamente a carga parasitária e a infectividade de cães para os flebotomíneos (MIRÓ et al., 2008).

No Brasil, o tratamento é defendido pela Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (ANCLIVEPA) e era proibido pelo Ministério da Saúde (MS). O MS juntamente com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio de uma Portaria Interministerial nº 1426 proibiu o tratamento da LVC com produtos de uso humano ou não registrados pelo MAPA (BRASIL, 2014).

Não existe nenhum tratamento de leishmaniose que permita alcançar a cura parasitológica. Os tratamentos disponíveis conseguem apenas atingir a cura clínica, com remissão dos sintomas e diminuição do título de anticorpos dos animais (BANETH; SHAW, 2002; CIARAMELLA; CORONA, 2003; MIRÓ et al., 2008).

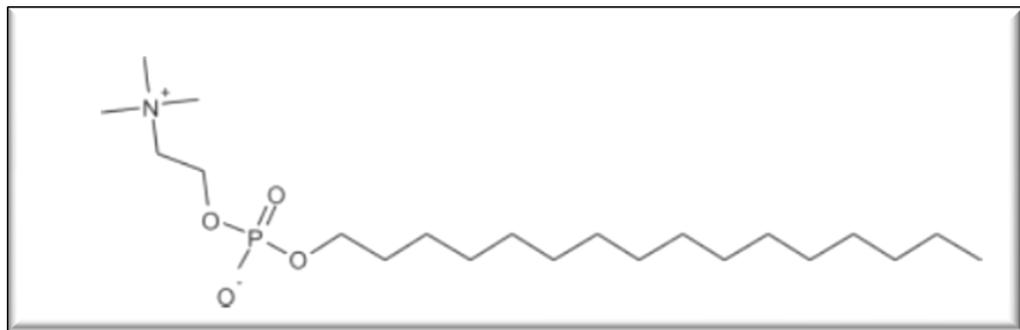
Em uma nota técnica conjunta do MS/MAPA (001/2016) foi autorizado o registro do produto importado Milteforan[®] que tem como princípio ativo a miltefosina. A nota ressalva que o tratamento da LVC não se configura uma medida de saúde pública para o controle da doença. O animal tratado ainda configura como reservatório, não sendo assim, a resolução total do problema (CRMV-RS, 2016).

2 MILTEFOSINA

A miltefosina (MT) pertence à classe das alquilfosfocolinas, são ésteres de fosfocolina de álcoois alifáticos de cadeia longa. As alquilfosfocolinas estão estruturalmente relacionadas ao grupo dos alqui-lisofosfolípídeos, análogos sintéticos de lisofosfatidilcolina ou lisolectina sem o esqueleto de glicerol (DORLO et al., 2012).

O nome químico da MT é hexadecil 2- (trimetil azanium) fosfato de etila, também conhecido como hexadecilfosfocolina. Sua fórmula empírica é $C_{21}H_{46}NO_4P$ e o peso molecular igual a 407,57 g/mol (Figura D). É um composto anfifílico e zwitteriônico devido ao grupo amino quartenário carregado positivamente (carregado permanentemente) e ao grupo fosforil carregado negativamente (DORLO et al., 2012).

Figura D: Estrutura molecular da Miltefosina



Fonte: Fernandes, 2016.

2.1 Mecanismo de ação

Originalmente, a MT foi desenvolvida para o tratamento de câncer de mama e outros tumores sólidos (BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2008; OLLIARO; SUNDAR, 2007).

É possível que este fármaco atue na leishmania semelhante a sua atuação nas células tumorais, induzindo a apoptose e alterando as vias de sinalização celular mediada por lipídeos (ARTHUR; BITTIMAN, 1998).

A MT é um leishmanicida tóxico para as leishmanias pois aumenta a ativação dos linfócitos T e macrófagos, importantes na destruição do parasito (BANETH; SHAW, 2002). Já é usado há vários anos na terapêutica da leishmaniose humana, tendo sido introduzida recentemente uma formulação específica para uso veterinário (VIRBAC, 2016).

Devido a estrutura química, a MT possui uma alta afinidade por membranas, e assim os primeiros alvos moleculares deste fármaco se encontram em nível de membrana plasmática (BLITTERSWIJK; VERHEIJ 2008).

Existe uma multiplicidade de propostas de mecanismos potenciais da MT. Sugere-se que a MT apresenta mais de um sitio molecular de ação (DORLO, 2012).

Danos a membrana flagelar, inibição da síntese de fosfatidilcolina, interferência com o metabolismo alquilfosfolípido, biossíntese de glicosilfosfatidilinositol, modulação da homeostase de cálcio e indução da apoptose tem sido relatados como possíveis mecanismos de ação (KEDZIERSKI, 2009).

2.2 Farmacocinética

Após a administração oral, a absorção da droga é completa no trato gastrointestinal, com biodisponibilidade absoluta de 94% em cães. Atinge a concentração máxima entre um período de 4 a 48 horas e apresenta meia vida de 159 horas para a sua eliminação (MAYNARD et al., 2006)

2.3 Vantagens

Por se tratar de um fármaco com administração por via oral, desponta se como a melhor alternativa para o tratamento da LV (JHA et al., 1999). Experimentos in vivo e in vitro mostraram eficácia deste fármaco no tratamento de infecções causadas por *L. donovani* (CROFT; SNOWDON; YARDLEY, 1996; LE FICHOUX et al., 1998).

Nos estudos em humanos, verificou-se que a eficácia da miltefosina era semelhante à dos antimoniais pentavalentes, podendo ser particularmente útil quando ocorre resistência aos antimoniais (CHATTERJEE; SUNDAR 2006; MOHEWBALI et al., 2007).

2.4 Precauções e Cuidados

A sua utilização requer cuidados e que o proprietário tenha conhecimento das regras de boa utilização do produto. Devem ser tomadas precauções, tais como, utilização de luvas durante a manipulação, armazenamento em local apropriado, evitar contato com as mucosas e não deixar crianças e grávidas manipularem o produto (MAYNARD et al., 2006).

2.5 Efeitos Adversos

Os principais efeitos adversos ocorrem no trato gastrointestinal, com isso, os animais podem apresentar vômitos, diarreias e inapetência. Surgem durante os primeiros dias de tratamento principalmente, podendo ser, na maioria das vezes, auto-limitantes (CHATTERJEE; SUNDAR, 2006; GROUSSON; MÉDAILLE; VISCHER, 2007; MOHEBAL et al., 2007).

Este fármaco pode aumentar os níveis sanguíneos de transaminases, elevar a uréia e creatinina (FISCHER et al., 2001). A miltefosina não deve ser administrada a cadelas gestantes ou em aleitamento pois é teratogênica (GROUSSON; MÉDAILLE; VISCHER, 2007).

2.6 Excreção

A MT não tem excreção renal, e por isso pode ser utilizada em cães que tenham a função renal comprometida. A miltefosina é parcialmente excretada pelas fezes (GROUSSON; MÉDAILLE; VISCHER, 2007).

2.7 Dosagem

Tem que ser administrada junto com o alimento, geralmente misturadas na ração ou diretamente na boca do animal. A dose diária é de 2mg/kg, durante 28 dias (MAYNARD et al., 2006; GROUSSON; MÉDAILLE; VISCHER, 2007).

3 MEDIDAS PREVENTIVAS

O desenvolvimento de vacinas anti-LVC é uma das alternativas na tentativa de controlar a crescente expansão da doença (MAROLI et al., 2001; REIS et al., 2006). No mercado brasileiro há uma vacina Leish-tec[®] (Hertape Calier S.A) que é recombinante e preconiza o exame sorológico antes da vacinação para comprovação da soronegatividade e o protocolo vacinal compreende três vacinações no intervalo de 21 dias e revacinação anual. Uma das vantagens deste tipo de vacinas recombinantes, relaciona-se ao fato de empregar antígenos caracterizados, em que suas propriedades imunogênicas das diferentes porções da molécula possam ser identificadas e caracterizadas (REIS et al., 2006).

O antígeno A2, no caso do gênero *Leishmania* que atualmente é considerado o antígeno melhor caracterizado, demonstrou ser capaz de induzir uma resposta imune protetora contra LVC. Esse antígeno é um fator de virulência de *Leishmania*, associado à capacidade de visceralização dos parasitos (ZANIN et al., 2007). Entretanto, as vacinas ainda não têm sido utilizadas como medidas de controle pelo Ministério da Saúde Brasileiro (BRASIL, 2014).

Na Europa vem sendo comercializada a vacina CaniLeish[®], e resultados promissores têm sido observados. A vacina surge nesse contexto como uma alternativa para o controle da doença (ALVAR; MORENO, 2002; GONTIJO; MELO, 2012).

Outra alternativa utilizada para o controle e proteção individual são os compostos que apresentam um efeito repelente sobre o vetor e inseticida. Neste cenário, os piretróides sintéticos são os produtos mais utilizados, gerando poucos efeitos tóxicos em cães e boa eficácia contra o vetor (BRASIL, 2014).

Diferentes produtos distinguem-se sobre os modos de aplicação sobre os animais. Há os produtos de liberação lenta, como as coleiras, spot-on e spray ou seja, formulações que apresentam diversas maneiras de liberar o inseticida, fornecendo uma proteção completa em diferentes épocas e exigindo distintos tempos de aplicações (BRASIL, 2014).

As coleiras impregnadas com deltametrina demonstraram não só uma redução na taxa de alimentação dos flebotomíneos como também uma diminuição do seu tempo de vida, o que leva a uma diminuição da taxa de propagação da doença (ZANIN et al., 2007).

A apresentação sob a forma de coleiras tem como vantagem a fácil utilização, e longa duração de ação de 4 a 8 meses. O aumento da taxa de sucesso é também devido ao fato de se diminuir o grau de esquecimento por parte dos proprietários (MAROLI et al., 2001).

Foi demonstrado que o uso de produtos spot-on (tópico) a base de permetrina (65%), em um estudo realizado numa área endêmica de LV, promoveu redução da incidência de infecção no grupo tratado. Testaram no Brasil o uso de cortinados impregnados com deltametrina como barreira física em comparação aos cortinados não tratados. Os achados apontaram que esta estratégia aumentou o efeito como barreira física, bem como a mortalidade de flebotomíneos (COURTENAY; QUINNELL, 2009).

Uma outra opção proposta para cães foi o uso tópico pour-on (aplicação no dorso do animal) à base de duas formulações de deltametrina (concentrado para emulsão e concentrado em suspensão) com o qual foi observado uma proteção e efeito repelente por até 8 meses. Estes achados mostraram que esta prática ofereceu potencial proteção, semelhante à utilização de coleiras de cão impregnadas com deltametrina (COURTENAY; QUINNELL 2009).

As estratégias de controle são executadas por meio da vigilância de casos humanos, vigilância e controle de casos caninos (eutanásia de animais soropositivos), controle químico vetorial e ações de educação em saúde desenvolvidas na comunidade e em escolas (BRASIL, 2014; OMS, 2015). Ações de vigilância e controle do calazar em Araguaína, tem sido desenvolvidas rotineiramente, bem como o envolvimento da comunidade em ações preventivas (ASCOM, 2016).

O trabalho de borrifação não é realizado apenas nas residências em que ocorreram casos de leishmaniose, mas em um raio que favoreça o controle do inseto transmissor. O controle químico é apenas uma das ações do programa e que a principal ação ainda é a limpeza e/ou a manutenção nas residências por parte dos proprietários (ASCOM, 2016).

São realizados mutirões de limpeza nos bairros periféricos e uma constante visita dos agentes de endemias e agentes de saúde nas residências observando a limpeza do local e orientando os proprietários como medida de ação preventiva (ASCOM, 2016).

As estratégias, juntamente com a conscientização e engajamento da população local são prerrogativas essenciais para a prevenção da leishmaniose. É necessário que ocorra todos os esclarecimentos a respeito da doença para que assim, o combate à doença seja efetivo e gere resultados na diminuição das estatísticas dos casos de leishmaniose tanto humano quanto canino no município e no Estado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J.; CANAVACATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, n. 1, p. 1-87, 2004.

ALVES, G. B. B.; PINHO, F, A.; SILVA, S. M. M. S.; CRUZ, M. S.P.; COSTA, F. A. L. Cardic and pulmonar alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania Leishmania chagasi*. **Brasilian Journal of Medical Biological Research**. 43(3): 310-315. 2010.

ALVES, M. C. G. P. Dimensionamento da população de cães e gatos do interior do Estado de São Paulo. **Rev. de Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, n. 6, 2005.

ANDRADE, B. B. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current Insights. **Scand J Immunol**, [s.l.], v. 66, n. 2-3, p.122-127, aug. 2007.

ARTHUR, G.; BITTMAN R. **The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids**. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1390, p. 85-102, 1998.

ASCOM; 2016. **Prefeitura de Araguaína**. Disponível em: <<http://www.araguaina.to.gov.br/portal/paginas.php?p=not¬=noticias&id=2030>> Acesso em: 22 set 2017.

BANETH, G. SHAW, S.E. (2002) Chemotherapy of canine leishmaniosis, **Veterinary Parasitology**, 106 (4), 315-324.

BANETH G, SOLANO-GALLEGOS L. Leishmaniasis. In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 4 a ed. Philadelphia: **Elsevier Saunders**, 2012. p.735-748.

BARATA, R.A. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2005. 38(5): 421- 25.

BLITTERSWIJKI, W. J.; VERHEIJ, M. “**Anticancer Alkylphospholipids: Mechanisms of Action, Cellular Sensitivity and Resistance, and Clinical**, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013. 180 p

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.120 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**, 2004,122p.

CAMARGO, J.B.; TRONCARELLI, M.Z.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n.71, p.86-92, 2007.

CHAVES, K. M. **Estudo Dirigido sobre as Leishmanioses**. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Coordenação de Minas Gerais. Belo Horizonte, Janeiro de 1996.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an emerging infection. **The Society for Investigative Dermatology**, [s.l], v. 6, n. 3, p.175-182, dec. 2001.

CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L.; PERO, M. E.; CORONA, M.; LOMBARDI, P.; AVALLONE, L.; PERSECHINO, A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 3, p. 465-467, 2005.

CIARAMELLA, P. CORONA, M. (2003). Canine leishmaniasis: therapeutic aspects. **Compendium**, v. 25, p.370-375.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

CRMV-RS. **NOTA TÉCNICA Nº 11/20161 Assunto: Confirmação de Caso Autóctone de Leishmaniose Visceral em um Paciente Humano em Porto Alegre**. Disponível em: http://www.crmvrs.gov.br/PDFs/NT_Leishmaniose_Poa.pdf. Acesso em: 05 dez 2016.

CROFT, S.L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anti-cancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 38, p.1041-1047, 1996.

DANTAS- TORRES, F. BRANDÃO – FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151-156, jun. 2006.

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A review on biology, epidemiology and public health significance of leishmaniasis. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, [s.l.], v. 04, n. 02, p.1-7, 2013.

DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, J. H. BEJINEN, P. J. de VRIES, "Miltefosine: A review of its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis," **J. Antimicrob. Chemother.**, vol. 67, no. 11, pp. 2576–2597, 2012.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.276-288, 2012.

ERZA, N.; OCHOA, M. T.; CRAFT, N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.248-257, 2010.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 5, n.28, p.36-44, 2000.

FELIPE, I.M.A.; AQUINO, D.M.C.; KUPPINGER, O.; SANTOS, M.D.C.; RANGEL, M.E.S.; BARBOSA, D.S.; BARRA, A.; WERNECK, G.L.; CALDAS, A.J.M. **Leishmania infection in humans, dogs and sand flies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.106, n. 2, p. 207-211, 2011.

FERNANDES, K. S. **Estudo das Alterações da Miltefosina com Membranas de *L. Leishmania amazonenses* e Macrófagos Peritoneais**. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Federal do Goiás, Goiânia, 2016.

FERRARI, H.F; RIBEIRO, D.; LUVIZOTTO, M.C.R. **Miocardite Associada a *Leishmania sp* em cao - Relato de caso**. In: 10 FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. Anais do Forum de Leishmaniose Visceral canina 2006. p.48.

FISCHER, C.; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 190:p. 85-87, 2001.

GODOY, K. C. S. **Análise dos indicadores de lesão miocárdica em cães do com leishmaniose visceral naturalmente infectados**. 2015. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

GONTIJO C. M. F, MELO M. N. **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas**. Revista brasileira de epidemiologia, 2004; 7(3): 338-349 interactions overview. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.276-288, 2012.

GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3. Ed. Saint Louis: **Saunders Elsevier**, 2006.p. 685-698.

IKEDA-GARCIA, F. A. FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico da Leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, v. 71, p. 34-42, 2007.

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

JHA, T.K; SUNDAR, S; THAKUR, C.P; BACHMANN, P; KARBWANG, J; FISCHER, C; VOSS, A; BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent for treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, p. 1795- 1800, 1999.

KEDZIERSKI, L.A. "Leishmaniasis: Current Treatment and Prospects for New Drugs and Vaccines.,". **Curr. Med. Chem.**, vol. 16, no. 5, pp. 599–614, 2009.

LAISON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Memórias Inst. Oswaldo Cruz. 2005; v.100, n.8, p. 811–27. **leishmaniasis. Immunology and Cell Biology**, [s.l], v. 85, p. 138-147, 2007.

LE FICHOUX, Y.; ROUSSEAU, D.; FERRUA, B.; RUETTE, S.; LELIEVRE, A.; GROUSSON, D.; KUBAR, J. **Short- and long- term efficacy of hexadecylphosphocoline against established *Leishmania infantum* infection in Balb/c mice. J. Antimicrob. Chemother**, v. 42, p. 654-658, 1998.

LUVIZOTTO, M.C.R. **Miocardite Associada a *Leishmania sp* em cao - Relato de caso.** In: 10 FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. Anais do Forum de Leishmaniose Visceral Canina, 2006. p.48.

MAIA, C.; CAMPINO L. **Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection.** Vet Parasitol. 2008. Dec;158(4):274-87.

MAIA-ELKHOURY A.N.S.; ALVES W.A.; SOUSA-GOMES M.L.; SENA J.M.; DE, LUNA E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**. 2008;24(12):2941–7.

MAYNARD, L., WOERLY, V., SANQUER, A.; MEDAILLE, C. (2006). Clinical efficacy of miltefosine oral solution in the treatment of canine leishmaniasis [abstract]. In Proceedings of the 31st annual world congress of the World Small **Animal Veterinary Association**, Prague, Czech Republic, 11-14 October.

MAROLI, M., MIZZONI, V., SIRAGUSA, C., D'ORAZI, A., GRADONI, L. (2001). Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin impregnated dog collars in southern Italy, **Medical and Veterinary Entomology**, 15, 358-363.

MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A. D. Review Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 2, p. 114, 2007.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Qjm**, [s.l.], v. 107, n. 1, p.7-14, june. 2013.

MELO, H. **Condutas em doenças infecciosas**. Rio de Janeiro: Medsi, 2004. P569-577.

MIRANDA, G. M. D. **Leishmaniose visceral em Pernambuco: a influência da urbanização e da desigualdade social**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Ageu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M.G., OLIVA, G., BANETH, G. (2008). **Canine leishmaniosis –new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two**, Trends in Parasitology.

MOHEBAL, M., FOUTUB, A., HOOSHMAND, B., ZAREI, Z., AKHOUNDI, B., RAHNEMA, A., RAZAGHIAN, A.R., KABIR, M.J.; NADIM, A. (2007). Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic leishmaniasis (ZCL). **PubMed**.

MONTEIRO. E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; MACHADO–COELHO, G.L.L.; ROCHA, M.F.; FONTES-DIAS, C.; DIAS, E.S. Leishmaniose Visceral: Estudo de Flebotomíneos e Infecção Canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 38:147 – 152, 2005.

MORAES-CORREIA, V.R.; MONTEIRO, A.M.V.; CARVALHO, M.S.; WERNECK, G.L. Uma aplicação do sensoriamento remoto para a investigação de endemias urbanas. **Cadernos de Saúde Pública** 2007; 23 (5). Rio de Janeiro.

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

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Medicina interna de pequenos animais. 3. Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2006. P. 1265-1266.

NIETO, A. **Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model**. **Vet Res**, [s.l.], v. 42, n.1, p.39-52, 2011.

OLIVEIRA, C. B. DA S. **Atividade dos constituintes da saliva de flebotomíneos na infecção por Leishmania e sua possível utilização no controle da Leishmaniose: uma revisão** / Cibele Beatriz da Silva Oliveira. - Natal, 2016. Disponível em: <<http://monografias.ufrn.br/jspui/handle/123456789/3364>> Acesso: em: 31 jul 2017

OMS. 2015. **Leishmaniasis fact sheet no. 375**. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. > Acesso em: 28 de Jul 2017.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 9, p.1290-1296, sept. 2009.

PONTE-SUCRE, A. **Physiological consequences of drug resistance in Leishmania and their relevance for chemotherapy**. *BioMed Central*, v, 14, n. 2, oct. 2003.

QUINNELL R. J, COURTENAY O. **Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis**. *Parasitology*. 2009 Dec;136(14):1915-34.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fio Cruz, 2003. 360 p.

READY, P. D. **Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents**. *Annual Review of Entomology*, [s.l.], v. 58, n. 1, p.227-250, jan. 2013.

REBÊLO, J.M.M. **Flebótomos vetores das leishmanioses. Manual para técnicos e profissionais da área de saúde**. Universidade Federal do Maranhão. 1999, São Luis. 32p.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O., CORREAOLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical / hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

REY, L. **Parasitologia**, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCHA, Ana Maria Sampaio. **Prevalência da Leishmaniose visceral canina na terra indígena Xakriabá, norte de Minas Gerais, Brasil**. 2015.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. **Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas**. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 251-262, dec. 2014.

SESAU, 2017. Disponível em: < <http://conexaoto.com.br/2017/05/20/sesau-registrou-no-estado-quase-9-mil-casos-de-calazar-em-caes-e-230-em-humanos-para-ong-eutanasia-nao-e-solucao>.> Acesso em: 20 jul 2017.

SOLANO-GALLEGO L.; KOUTINAS A.; MIRO G.; CARDOSO L.; PENNISI MG.; FERRER L.; BOURDEAU P.; OLIVA G.; BANETH G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**. 2009, 165 (1-2): 1-18. 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. (2006). **Visceral leishmaniasis –current therapeutic modalities**, *Indian J. Med. Res*, 123, 345-352.

SUNDAR, S.; P. L. OLLIARO, “Miltefosine in the Treatment of Leishmaniasis: Clinical Evidence for Informed Clinical Risk Management,” *Ther. Clin. Risk Manag.*, vol. 3, no. 5, pp. 733–740, 2007.

STANLEY, A.; ENGWERDA, C. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology*, [s.l.], v. 85, p. 138-147, 2007.

TEIXEIRA, D. E. The cell biology of *Leishmania*: How to teach using animations. *Plos Pathog*, [s.l.], v. 9, n. 10, p. e1003594, oct. 2013.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, [s.l.], v. 26, n. 2, p.309-322, june. 2012.

VIRBAC BRASIL, 2016. Disponível em: <https://br.virbac.com/home/espaco-leishmaniose.html>. Acesso em: 05/02/17.

VISCHER, C., GROUSSON, D.; MÉDAILLE, C. (2007). **Preliminary safety study of the combination therapy of miltefosine and allopurinol in dogs [abstract]**. In Proceedings of the 32nd annual world congress of the World Small Animal Veterinary Association, Sydney, Australia, 19-23 August.

VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol*, [s.l.], v. 16, n. 2, p.99-109, feb. 2015.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad. Saúde Pública*. 2008;24(12):2937–40.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Gainesville, Associated Publishers American Entomological Institute**, p. 881, 1994. 881, 1994.

ZANIN F. H.; COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; MARQUES-SILVA, E. A.; SILVA, C. 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 and Infection*, v. 9, n. 9, p. 1070-1077, 2007.

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Screening *Leishmania donovani*-specific genes required for visceral infection. *Molecular Microbiology*, [s.l.], v. 77, n. 2, p.505-517, june. 2010.

CAPÍTULO II

MILTEFOSINA NO TRATAMENTO DE CÃES COM LEISHMANIOSE: EFEITOS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença infecciosa causada por um protozoário, pertencente ao gênero *Leishmania*. É uma antropozoonose de elevada importância devido ao aumento na taxa de mortalidade humana nas regiões consideradas endêmicas, ao grande número de cães infectados e ao intenso parasitismo desses animais. A liberação da miltefosina (Milteforan[®]), pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), para tratamento dos animais ocorreu em outubro de 2016; esse medicamento é utilizado nos EUA e na Europa há vários anos e com bons resultados. Realizou-se avaliação de 20 cães, sendo 10 animais pertencentes ao grupo 1 (G1), submetidos ao tratamento com a miltefosina, e o grupo 2 (G2), com 10 animais sem tratamento. Os dados foram coletados em dois momentos chamados de (M1) e (M2), sendo pré e pós tratamento respectivamente. Objetivou-se avaliar os efeitos hematológicos e bioquímicos sérico em resposta ao tratamento, na observância de possíveis efeitos sobre estes parâmetros. As principais alterações hematológicas encontradas foram: hemoglobina, hemácias e hematócrito abaixo das referências que caracterizaram anemia. Na hematologia, houve diferença estatística significativa entre o pré e pós tratamento nos valores de hematócrito e plaquetas ocorrendo um aumento na média dos mesmos. Nos exames bioquímico séricos, houve alterações significativas para os parâmetros: alaninoaspartatotransferase e globulinas, causando diminuição dos valores médios, albumina e relação albumina/ globulina aumentaram seus valores. Os cães que receberam o tratamento com a miltefosina apresentaram uma melhora clínica e não foi observado efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos.

Palavras chave: leishmania, hemograma, miltefosina, bioquímica

CAPÍTULO II

MILTEFOSINA NO TRATAMENTO DE CÃES COM LEISHMANIOSE: EFEITOS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is an infectious disease caused by a protozoan belonging to the genus *Leishmania*. It is an anthroponosis of enormous importance due to the increase in the human mortality rate in the regions considered endemic, the large number of infected dogs and the intense parasitism of these animals. The release of miltefosine (Milteforan®) by the Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) for treatment of the animals took place in October 2016; this drug has been used in the USA and Europe for several years and with good results. A total of 20 dogs were evaluated, 10 of which belonged to group 1 (G1), treated with miltefosine, and group 2 (G2), with 10 animals without treatment. The data were collected in two moments called (M1) and (M2), being at pre and post treatment respectively. The objective was to evaluate the hematological and biochemical effects of serum in response to treatment, observing possible effects on these parameters. The main hematological changes were: low hemoglobin, red blood cells and hematocrit that characterized anemia. In the hematology, there was a significant statistical difference between the pre and post treatment in the hematocrit and platelet values, with an increase on these values. In the biochemical exams, there were significant alterations to the parameters: alaninoaspartatettransferase and globulins, causing a decrease in mean values, albumin and albumin / globulin ratio increased their values. Dogs receiving treatment with miltefosine showed clinical improvement and hepatotoxic and nephrotoxic effects were not observed.

Keywords: leishmania, blood count, miltefosine, biochemistry

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica progressiva, se constituindo então de uma antropozoonose de elevada importância devido ao aumento na taxa de mortalidade humana em regiões endêmicas, ao grande número de cães infectados e ao intenso parasitismo que ocorre nesses animais (CARVALHO NETA et al., 2007).

As leishmanioses são classificadas em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea (LC), causadas por diferentes espécies do parasito. A infecção, nas várias formas da doença, caracteriza-se por parasitismo de células do sistema fagocítico mononuclear da derme, mucosas ou vísceras, como fígado, baço e medula óssea (QUINELL; COURTENAY, 2009).

O Brasil está entre os cinco países do mundo mais prevalentes para LVC (RONDON et al., 2008). A importância das leishmanioses também se verifica no impacto que produzem dentro da saúde pública, notadamente pela alta incidência, letalidade e pelas implicações econômico-sociais que ocorrem pela depleção da força de trabalho (BORASCHI; NUNES, 2007).

Nos países onde a LV é zoonótica, como no caso do Brasil, os cães desempenham um papel fundamental na epidemiologia e por isso, são considerados os principais reservatórios para a doença humana. A presença de formas amastigotas na superfície da pele do animal é uma das causas da importância desse reservatório devido a convivência dos humanos com esses animais de estimação em ambientes onde estão presentes os vetores (ALVAR et al., 2004).

A apresentação clínica da leishmaniose em cães é muito variada, mimetiza outras doenças e deve ser incluída como diagnóstico diferencial importante. Cerca de 70% dos animais infectados podem ser assintomáticos, ou seja, não apresenta alterações clínico patológicas da doença. Somando-se a isto, o diagnóstico é

bastante complexo, principalmente neste grupo de animais (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Os cães podem apresentar lesões alopecicas, descamativas, não pruriginosas, localizadas ou generalizadas, decorrentes de dermatite esfoliativa, ulcerativa, papular, nodular ou pustular. Os sinais clínicos mais frequentes observados na LVC incluem dificuldade locomotora, perda de peso, polidipsia, apatia, anorexia, vômito, diarreia, polifagia, epistaxe e melena. Dentre os achados de exame físico, merecem destaque a linfadenomegalia, caquexia, hipertermia, esplenomegalia, uveíte e conjuntivite (SALZO, 2008).

Os achados laboratoriais mais frequentes são anemia, trombocitopenia, diminuição da relação A/G, hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hiberoglobulinemia, azotemia e proteinúria (ALMEIDA et al., 2005; AMUSATEGUI et al., 2003; FEITOSA et al., 2000; NOLI, 1999).

A detecção precoce dos cães infectados é primordialmente fundamental para que se possa impedir a expansão da doença e acaba por ser uma prerrogativa essencial para o controle da mesma (MAIA; CAMPINO, 2008; ORDEIX et al., 2005).

A eliminação do cão considerado positivo para leishmaniose, sendo assintomático ou não, é o ponto mais delicado da relação animal-tutor, influenciando na atuação do veterinário, que se depara com a questão legal (leishmaniose é uma doença de notificação compulsória, ou seja, obrigatória) (TIBAGY et al., 2005).

Programas de controle estão direcionados à eliminação dos reservatórios, que são os cães e dos vetores (mosquitos), o que tem sido bastante discutido. Além do diagnóstico precoce e o tratamento dos casos humanos, essas estratégias parecem ser as mais importantes para reduzir os casos fatais (ROMERO; BOELAERT, 2010).

Em 2016, em Nota Técnica conjunta, nº 001/2016, os Ministérios da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o da Saúde (MS) autorizaram o registro do produto Milteforan[®], principal droga utilizada no tratamento da LVC que até então não era utilizada no tratamento da doença no Brasil (VIRBAC, 2016).

A presente pesquisa objetivou observar as alterações hematológicas e bioquímicas dos cães com leishmaniose em tratamento com a miltefosina no Município de Araguaína – TO.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aprovação do Comitê de Ética (CEUA)

O projeto de pesquisa foi aceito e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins (UFT) sob o protocolo de nº 23101.003786/2017-31.

2.2 Local

O experimento foi realizado em uma Clínica Particular do Município de Araguaína no Tocantins. Os exames hematológicos, bioquímicos e parasitológico foram realizados no laboratório da mesma clínica. Os exames sorológicos e de PCR em laboratório conveniado. No período compreendido entre 01/08/17 a 01/11/17.

2.3 Animais

Foram utilizados 20 cães domésticos, *Canis lupus familiaris*, adultos, sem distinção de raça, sexo ou peso, sendo dez animais com diagnóstico positivo e dez com diagnóstico negativo para leishmaniose, com idade variando de 1 a 12 anos. Destes animais, oito eram machos e doze fêmeas, provenientes da casuística de uma clínica veterinária particular do Município de Araguaína- TO.

2.4 Triagem para composição dos grupos experimentais

O grupo experimental (G1) era composto pelos animais positivos nos testes parasitológico, sorológico (ELISA) e molecular (PCR). Já os animais do grupo controle (G2) foram escolhidos perante sorologia e parasitologia negativos.

2.4.1 Exame Parasitológico

O exame parasitológico foi realizado por avaliação da medula óssea através da punção da medula pelo osso esterno, foi realizado o esfregaço (3 lâminas por animal). A coloração foi feita com corante rápido tipo Panótico® e a observação das lâminas realizada em microscopia óptica com objetiva de imersão (1000x),

observando se toda a extensão da lâmina a procura de formas amastigotas no interior de macrófagos ou livres.

2.4.2 Diagnóstico Sorológico e Molecular (PCR)

Foi coletado 2mL de sangue da veia jugular e colocado em tudo sem anticoagulante para exame sorológico (Elisa) e encaminhado para laboratório de referência. Para o exame molecular, era coletado 2 ml de medula óssea por punção em osso esterno ou escápula, o conteúdo transferido para tubo com anticoagulante (EDTA) e encaminhado para laboratório de referência.

2.5 Exames hematológicos

O sangue foi coletado por punção venosa em jugular ou cefálica totalizando 5ml, em que 2mL foram transferidos para tubo com EDTA para realização dos exames hematológicos. Realizou-se a análise das hemácias, hemoglobina, plaquetas e leucócitos totais. Para os exames hematológicos utilizou-se um analisador hematológico veterinário automatizado (Poch-100 IV Diff) Roche Sysmex®.

2.6 Exames bioquímicos

Foi coletado 3mL de sangue e transferidos para tubo sem anticoagulante para a realização dos exames bioquímicos. Realizou-se a análise dos seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), uréia, creatinina, proteínas séricas totais e frações. Para esses exames, utilizou-se o soro no analisador automático por fotometria de absorbância (Cobas c111) Roche®.

2.7 Tratamento com Miltefosina

Previamente a Miltefosina, utilizou-se a Ondansetrona na dose 1mg/kg/SID/VO e Ranitidina 2mg/kg/BID/VO nos primeiros três dias de tratamento com o intuito de evitar os efeitos colaterais relacionados aos transtornos gastroentéricos. O protocolo de tratamento baseou-se na utilização da Miltefosina na dose de 2mg/kg/SID/VO por 28 dias consecutivos.

2.8 Coleta de dados

Os exames complementares (hematológicos e bioquímicos) foram realizados em dois momentos (M1 e M2) no grupo experimental (G1). Sendo o Momento 1 (M1) antes do tratamento com a Miltefosina (pré tratamento) e Momento 2 (M2) após o tratamento de 28 dias.

Para os animais do grupo controle (G2), os exames foram realizados apenas uma vez, quando os animais foram a clínica para consultas de rotina, sem sinais clínicos e sem queixas por parte do proprietário, sendo esses, considerados saudáveis.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando-se o software estatístico SAS 9.0 (SAS, 2012). Para testar a homogeneidade de variâncias utilizou-se o teste de Levene e para testar a normalidade dos erros, usou-se o Teste Shapiro-Wilk. As médias dos grupos foram comparadas através do teste T de Student, adotando-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha = 0,05$). A fim de atender as pressuposições necessárias para realização do Teste T, foi necessária a transformação de algumas variáveis. Assim, a transformação logarítmica na base natural mostrou-se adequada para normalizar e homogeneizar as variáveis, com exceção da uréia, em que a inversa do logaritmo natural mostrou-se adequada para que a variável atendesse as pressuposições para realização de testes paramétricos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação hematológica

As principais alterações encontradas foram: hemácia, hemoglobina e hematócrito abaixo das referências. Quanto aos resultados dos valores de hemácias, 80% dos cães apresentaram valores abaixo das referências no pré tratamento (G1-M1), esse percentual decaiu para 60% logo após o tratamento (G1-M2), obtendo-se uma redução de 20% nos cães que apresentavam essa alteração.

No parâmetro hemoglobina não houve alterações entre a porcentagem dos animais que apresentavam-se com hemoglobina abaixo das referências. A

porcentagem de cães que apresentaram hematócrito baixo decaiu em 10% após a utilização da droga.

Quanto aos resultados de contagem de plaquetas, destacou-se o fato de 60% dos animais do (G1-M1) apresentarem trombocitopenia e após o tratamento (G1-M2), esse percentual decaiu para 30%, equiparando se ao grupo controle (G2). Na Tabela 1 encontra-se as médias dos valores encontrados nos exames hematológicos no (G1) nos dois momentos (M1-M2) e no G2.

Tabela 1. Principais valores hematimétricos absolutos dos cães do G1 (com Leishmaniose) em dois momentos (M1 e M2) e do G2 (sem Leishmaniose)

Parâmetros	Referências	(G1-M1) Média	Mínimo Máximo	(G1-M2) Média	Mínimo Máximo	Teste T pareado (M1XM2)	(G2) Média	Mínimo Máximo
Eritrócitos	5,5-8,5	4,69	2,92-8,04	5,28	3,12-8,76	0,0664(NS)	6,32	5,07-7,45
Hemoglobina	12-18	10,22	6,2-17,8	11,53	6,5-19,2	0,0524(NS)	14,24	10-17,9
Hematócrito	37-55	31,40	18,7-50,3	35,77	20,9-58,9	0,0367*	42,68	35-50,3
Plaquetas	200-500	245,40(5,15)	29-802	346,50(5,63)	78-681	0,0306*	333,3	103-680
Leucócitos	7-17	11,83	5,6-27,7	12,41	6,3-21,2	0,4281(NS)	11,34	5,8 -15,3

Valores entre parênteses são as médias transformadas para validação das pressuposições estatísticas.

Os valores do teste T pareado são significativos quando menores que 0,05 ($P < 0,05$). Os valores com asterisco são significativos. A sigla (NS) não significativos.

Nos dois momentos do grupo 1 (G1), os valores médios de eritrócitos, permaneceram abaixo da referência. Obtendo se a média de $4,699 \cdot 10^6/\mu\text{L}$ para eritrócitos no pré tratamento (M1) e $5,283 \cdot 10^6/\mu\text{L}$ no pós tratamento (M2). Ocorrendo uma elevação de $0,584 \cdot 10^6/\mu\text{L}$ na média do pós tratamento (M2).

Mesmo com a elevação na média do pós tratamento, estatisticamente não houve diferenças entre os dois momentos analisados ($p=0,0664$). Permanecendo a média abaixo das referências e inferior ao G2 (grupo controle).

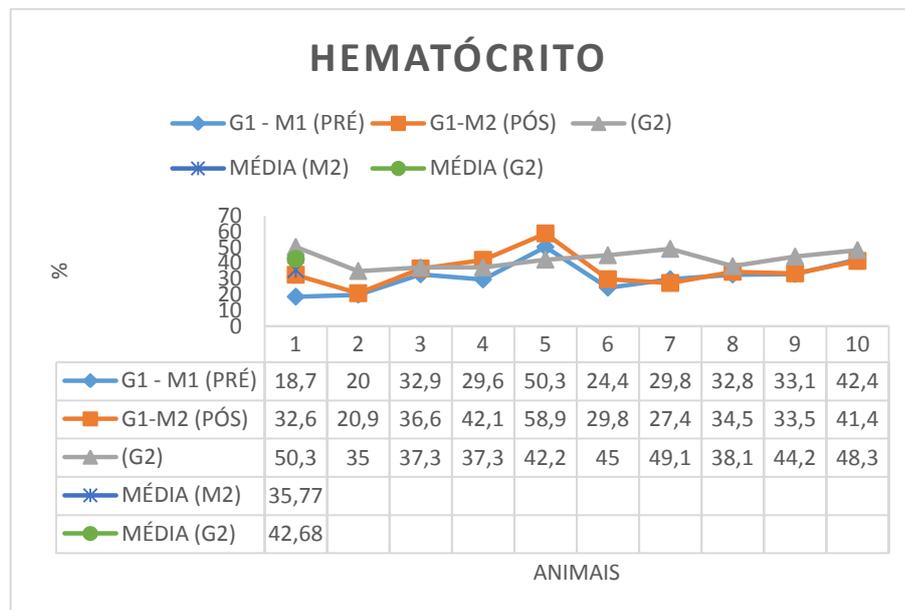
Em consonância, diversos autores citam que na LVC a anemia pode ocorrer por diversos mecanismos. A eritropoiese pode estar diminuída pelo caráter crônico, por perda de sangue, lise de hemácias e diminuição da massa eritrocitária por produção de auto-anticorpos que conseqüentemente levará a sequestro esplênico

(CIARAMELLA; CORONA, 2003; FELDMAN et al., 2000; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2007; MATTOS-JR et al., 2004).

Observou-se nos dois momentos (M1 e M2) que as médias para o parâmetro hemoglobina, permaneceram inferiores as referências e ao G2. A média elevou-se em 1,31 g/dL do pré para o pós tratamento. Embora o aumento na média, não configurou se como normalidade, continuando abaixo das referências. Para o parâmetro hemoglobina, não houve diferenças estatísticas ($p= 0,0524$) entre o pré e pós tratamento da variável analisada.

Dos parâmetros hematológicos avaliados, apenas hematócrito ($p=0,0367$) (Gráfico 1) e plaquetas ($p= 0,0306$) obtiveram valores estatisticamente diferentes pois ($p < 0,05$) no teste pareado entre o pré e pós tratamento dos animais com leishmaniose.

Gráfico 1 Representação dos valores de hematócrito nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias. Referência: 37-55 %.



Nos valores de hematócrito, notou se um aumento no valor da média nos pós tratamento em 4,37%, contudo, ainda apresentando valor médio abaixo da referência e do G2. Porém os valores de hematócrito pré e pós foram estatisticamente diferentes entre si ($p= 0,0367$). Os animais em tratamento quando comparados entre o antes e depois do tratamento melhoraram seu quadro hematológico culminando em melhora no quadro clínico geral dos animais.

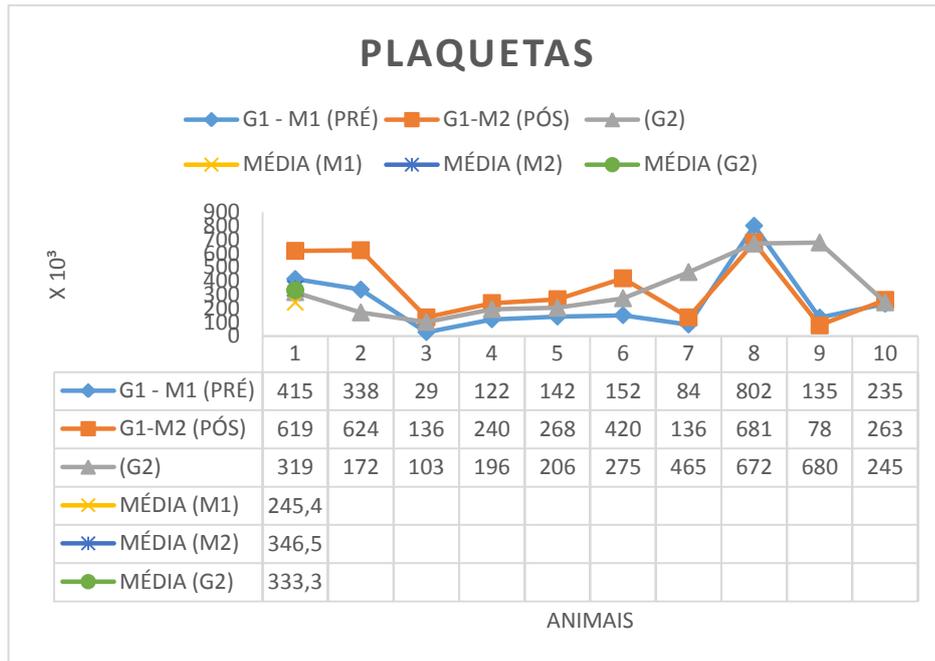
Braz et al. (2015) avaliaram 153 cães com LVC e encontraram anemia em 69,9% deles e Medeiros et al. (2008) na avaliação de 154 cães positivos, observaram quadro anemia em 60% deles, resultados semelhantes foram descritos pela literatura (BUSH, 2004; COSTA-VAL et al., 2007).

A anemia observada neste estudo antes do tratamento pode ser classificada como leve a moderada (hemácias – $4,70 \times 10^6 /\text{mm}^3$ e hematócrito – 31,40%), concordando com outros autores que obtiveram valores médios de contagem de hemácias e hematócrito de $4,83 \times 10^6 /\text{mm}^3$ e 30,37% e $4,50 \times 10^6 /\text{mm}^3$ e 31,5% (IKEDA-GARCIA et al., 2003; MATTOS JR et al., 2004). No pós tratamento a anemia pôde ser classificada como leve (hemácias – $5,28 \times 10^6 /\text{mm}^3$ e hematócrito – 35,77%).

A constatação de anemia na maioria dos animais é um achado já esperado em infecção canina por *Leishmania* spp. (FREITAS et al., 2012). Um estudo apontou que a anemia pode se desenvolver nesses animais após a hiperatividade do sistema retículoendotelial, pela falha na síntese de hemoglobina e por falhas na medula (REIS et al., 2006).

Alguns dados da literatura mostram que a LVC pode levar a redução no número de plaquetas (Gráfico 2) induzidas por vasculite e associadas á reação de hipersensibilidade tipo 3, aumento da destruição plaquetária e nefropatia e hepatopatia (FELDMAN et al., 2000).

Gráfico 2 Representação dos valores das plaquetas nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias. Referência para plaquetas: $200-500 \times 10^3$.



Os valores encontrados para o parâmetro plaquetas sofreram diferença estatística ($p= 0,0306$) culminando em aumento na média em $101,1 \times 10^3$, passando de 245,4 para 346,5 e assim, obtendo média maior que a do grupo controle (G2). O aumento na média para o parâmetro plaquetas foi a maior elevação observada nos exames hematológicos analisados. Com esse aumento, alguns sinais clínicos relacionados principalmente com a trombocitopenia desapareceram.

No estudo de Medeiros et al. (2008), o valor médio de contagem de plaquetas para cães reagentes esteve no limite mínimo de normalidade, embora 53,1% destes cães tenham apresentado trombocitopenia.

Segundo Luvizotto (2006) pode ocorrer acometimento de hemorragias devido hiperglobulinemia, sequestro esplênico de plaquetas, vasculite por imunocomplexos, aplasia, hipoplasia medular, uremia (dificultando a atividade plaquetária) e epistaxe (possivelmente por lesões na cavidade nasal).

A ocorrência de trombocitopenia em cães reagentes para LV pode decorrer do aumento na destruição plaquetária, além de distúrbios de trombocitopoiese e comprometimento do funcionamento renal e/ou hepático (FELDMAN et al., 2000).

Outro mecanismo na diminuição do número de plaquetas na LV pode estar associado à presença de imunoglobulinas anti-plaquetas ou aumento na destruição plaquetária, descrita em 63,3% dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* (CIARAMELLA et al., 2005; FREITAS et al., 2012; TERRAZANO et al., 2006).

Para a variável leucócitos totais ocorreu um pequeno aumento na média do pós tratamento, elevando a média em $0,58 \times 10^3/\mu\text{L}$. Tanto os valores do pré quanto do pós tratamento mantiveram-se dentro dos valores de referência em todos os grupos (G1 e G2) e em todos os momentos do experimento e não apresentaram diferenças estatísticas ($p= 0,4281$). O aumento na média não foi significativo. No presente estudo, todos os valores médios mantiveram-se dentro da normalidade, corroborando com as descrições de Amusategui et al. (2003).

No estudo de Freitas et al. (2012), o valor médio dos leucócitos esteve dentro dos limites de normalidade, o que pode ser atribuído ao processo crônico da doença, fato já relatado por Ikeda-Garcia et al. (2003) e Mattos-Júnior et al. (2004). Por se tratar de um processo crônico, a resposta leucocitária se modifica de acordo com a evolução da doença (MEDEIROS et al., 2008).

Apesar do hemograma ser uma ferramenta de diagnóstico laboratorial complementar que pode auxiliar no diagnóstico e prognóstico clínico da leishmaniose visceral canina, esta deve ser utilizada com cautela, pois as alterações observadas são comuns a outras doenças em cães (GEORGETTI et al., 2013).

4.2 Avaliação bioquímica sérica

As médias dos parâmetros bioquímicos ALT, uréia e creatinina (Tabela 2) permaneceram dentro da normalidade nos dois momentos assim como no G2.

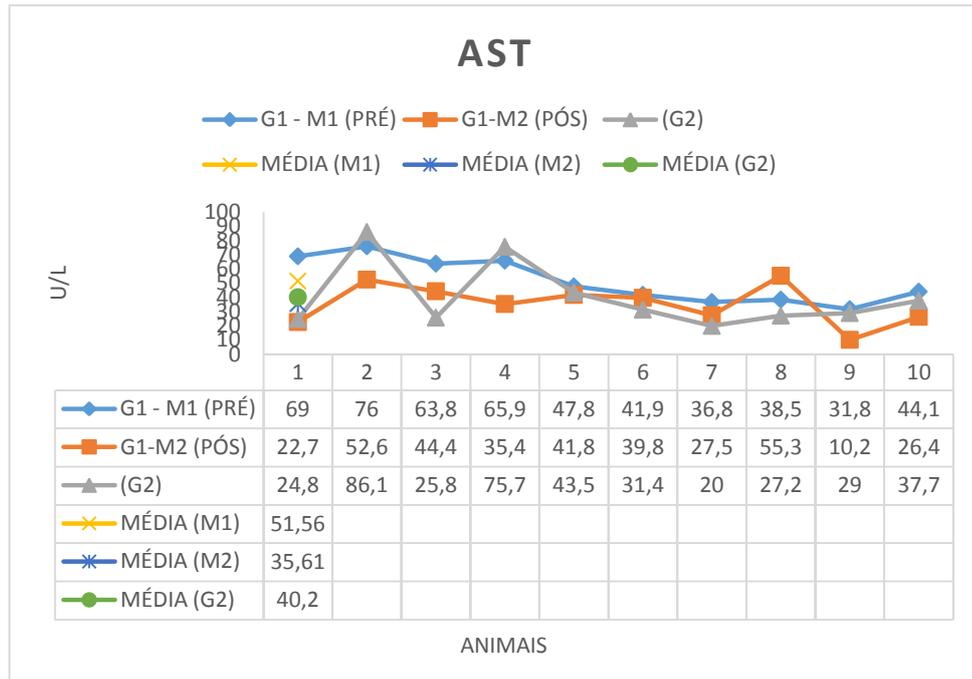
Tabela 2: Principais valores bioquímicos dos cães do G1 (com Leishmaniose) em dois momentos (M1 e M2) e no G2.

Parâmetros	Referências	(G1-M1) Média	Mínimo Máximo	(G1-M2) Média	Mínimo Máximo	Teste T pareado (M1XM2)	(G2) Média	Mínimo Máximo
ALT	10-88	44,43	13,4-129	48,4	16,4-173,1	0,5024(NS)	55,29	19,2-91,2
AST	23-66	48,4	31,8-76	11,53	10,2-44,4	0,0172*	40,12	20-86,1
URÉIA	15-65	53,06	18,93-208	36,22	25,1- 52,9	0,6639(NS)	29,16	21,44-43,61
CREATININA	0,5-1,5	0,58	0,4-0,8	0,66	0,4-0,8	0,193(NS)	0,77	0,5-1,2
PROTEÍNAS TOTAIS	5,3-7,6	8,52	5,98-10,3	7,74	5,22-10,7	0,0505(NS)	6,01	5,1-6,8
ALBUMINA	2,3-3,8	2,26	1,38-3,54	2,68	1,7-3,73	0,0172*	3,09	2,15-3,78
GLOBULINAS	2,4-4,8	6,26	2,56-8,21	5,05	2,25-8,32	0,0097*	2,91	1,32-3,73
RELAÇÃO A/G	0,5-1,7	0,42	0,17-1,38	0,65	0,28-1,62	0,0022*	1,18	0,7-2,86

Valores entre parênteses ao lado das médias são as médias transformadas para validação das pressuposições estatísticas. Os valores do teste T pareado são significativos quando menores que $p < 0,05$. Os valores com asterisco são significativos. A sigla (NS) significa não significativos.

Houve diferenças estatísticas entre o pré e pós tratamento para a enzima AST (Gráfico 3) ($p= 0,0172$) que resultaram na diminuição da sua média. Por não ter ocorrido elevação da mesma, não houve alterações clínicas relacionadas a enzima AST. A média dessa variável ficou abaixo das referências e do G2. Na avaliação da enzima ALT ($p= 0,5024$) não ocorreu diferenças entre o tratamento e a média permaneceu dentro das referências assim como no grupo controle. Os animais não apresentaram sinais clínicos que levariam a suspeitas de hepatopatias. Após a realização dos exames bioquímicos no pós tratamento foi possível notar que a droga não causou elevação das enzimas hepáticas mensuradas, não apresentando assim efeito hepatotóxico.

Gráfico 3 Representação dos valores de AST nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias. Referência: 23-66 u/L.



Houve uma diminuição significativa de AST em 15,95U/L entre o pré e pós tratamento. Os valores encontrados entre o pré e pós tratamento para a enzima ALT elevaram se em 3.97U/L permanecendo com as médias dentro da referência e inferior ao G2.

Na análise laboratorial, podem ser observados em animais com leishmaniose, aumento da alanina aminotransferase (ALT) (DIAS et al., 2008). Em dois animais do presente estudo exposto, verificou se a elevação da enzima hepática ALT no pré tratamento. Castro et al. (2012) observaram que os valores de ALT e AST permaneceram dentro dos valores fisiológicos citados na literatura em cerca de 70% dos cães, corroborando com nossos achados.

Em um pequena porcentagem de cães acometidos com a LVC é possível que ocorra acometimento hepático, ocasionando em perda de peso, apatia, vômitos, anorexia, polidipsia e poliúria (AMUSATEGUI et al., 2003; NOLI, 1999). Alguns autores afirmam ainda que, em relação a função hepática, os valores da fosfatase alcalina (FAL), da alanina aminotranferase (ALT), e da aspartato aminotransferase (AST) podem encontrar-se aumentados (GRADONI; TROTZ-WILLIAMS, 2003). Contudo, a lesão hepática não é, normalmente, severa, tendo tendência a normalizar após o tratamento (CIARAMELLA; CORONA, 2003).

Na avaliação renal, os valores de uréia e creatinina respectivamente não diferiram estatisticamente entre os momentos avaliados, permanecendo com as

médias dentro das referências para as variáveis analisadas ($p= 0,6639$ e $0,193$). A média dos valores de uréia decaíram entre os momentos analisados e foram maiores que a média do G2, a média da creatinina se elevou discretamente, porém, inferior ao grupo controle.

A avaliação dessas variáveis implica que não ocorreu alterações renais devido utilização da droga, não causando efeito nefrotóxico, visto que os valores das médias dos parâmetros uréia e creatinina avaliados não aumentaram o valor da média para valores acima das referências. Os animais em tratamento não apresentaram sinais clínicos decorrentes de nefropatia.

Nos dados do estudo em questão, as funções renais e hepáticas mantiveram-se sem alterações, corroborando com Miró (2007) que também observou manutenção das funções renal e hepáticas normais, permanecendo dentro das referências, o que pode ser observado também no grupo experimental G2.

Segundo Vischer et al. (2007) a miltefosina não tem efeito nefrotóxico, embora outros efeitos tóxicos não tenham sido totalmente descartados. Tem sido atribuído aos parâmetros renais valor prognóstico. Este é reservado quando os níveis de ureia e creatinina encontram-se persistentemente elevados, mesmo após o tratamento (CIARAMELLA; CORONA, 2003).

A deposição de imunocomplexos nos glomérulos pode acarretar em nefrite intersticial e glomerulonefrite membranoproliferativa, gerando comprometimento da função renal, e sendo, muitas vezes a principal causa da morte de cães com leishmaniose. A insuficiência renal pode estar presente em cães sem os sinais clínicos sistêmicos de leishmaniose (CIARAMELLA et al., 2005). A nefropatia pode ser causada pelo infiltrado de células T CD4+ detectadas na região glomerular e intersticial dos rins de cães com LVC (COSTA, 2011).

4.3 Avaliação das proteínas totais e frações

Nos dois momentos os valores das proteínas totais apresentaram se acima das referências e do G2. Não foram encontradas diferenças estatísticas para a variável bioquímica proteínas totais ($p= 0,0505$) entre o pré e pós tratamento com a droga.

As proteínas totais no pré tratamento estiveram acima dos valores de referência caracterizando assim, hiperproteinemia, divergindo dos valores

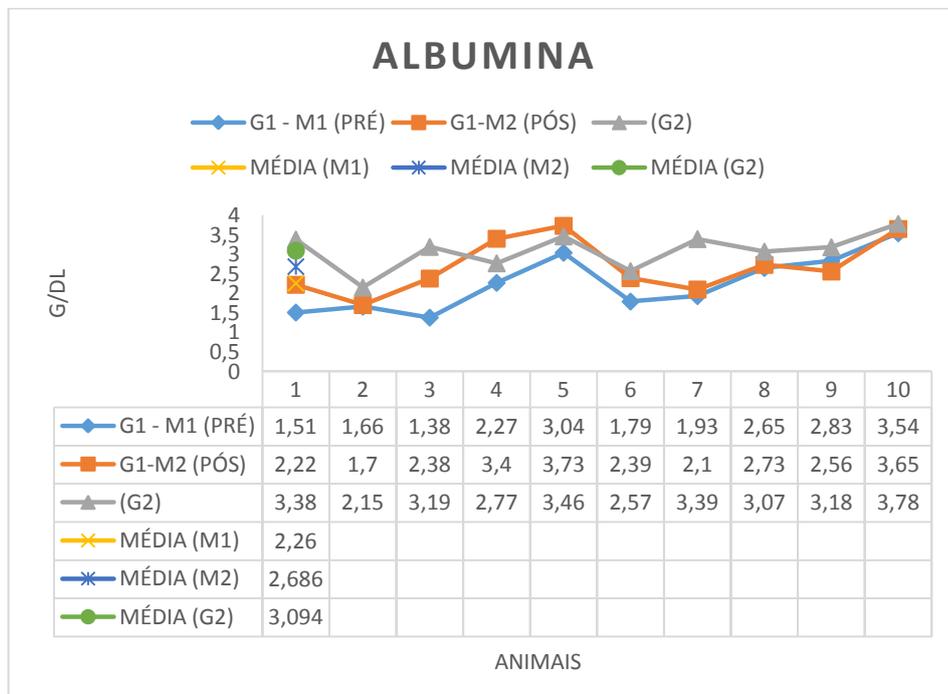
encontrados por Kiral et al. (2004) que caracterizaram hipoproteinemia em cães sintomáticos para LVC.

Na LVC, a hiperproteinemia decorre da ativação policlonal de linfócitos B e consequente produção elevada de anticorpos em que há hipoalbuminemia e aumento nos níveis de globulinas séricas, gamopatia (FELDMAN et al., 2000; IKEDA-GARCIA et al., 2003).

As proteínas totais séricas podem estar elevadas devido a hiperglobulinemia, entretanto, às vezes, pode se encontrar dentro dos parâmetros de normalidade quando a hipoalbuminemia é severa, mesmo com aumento das globulinas séricas (LAPPIN, 2004).

No pré tratamento os valores médios de albumina (Gráfico 4), apresentaram-se abaixo do valor de referência caracterizando hipoalbuminemia, corroborando com Medeiros et al. (2008). No pós tratamento os valores médios permaneceram dentro dos níveis de referência assim como no G2.

Gráfico 4 Representação dos valores de albumina nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias. Referências: 2.3-3.8 g/dL.



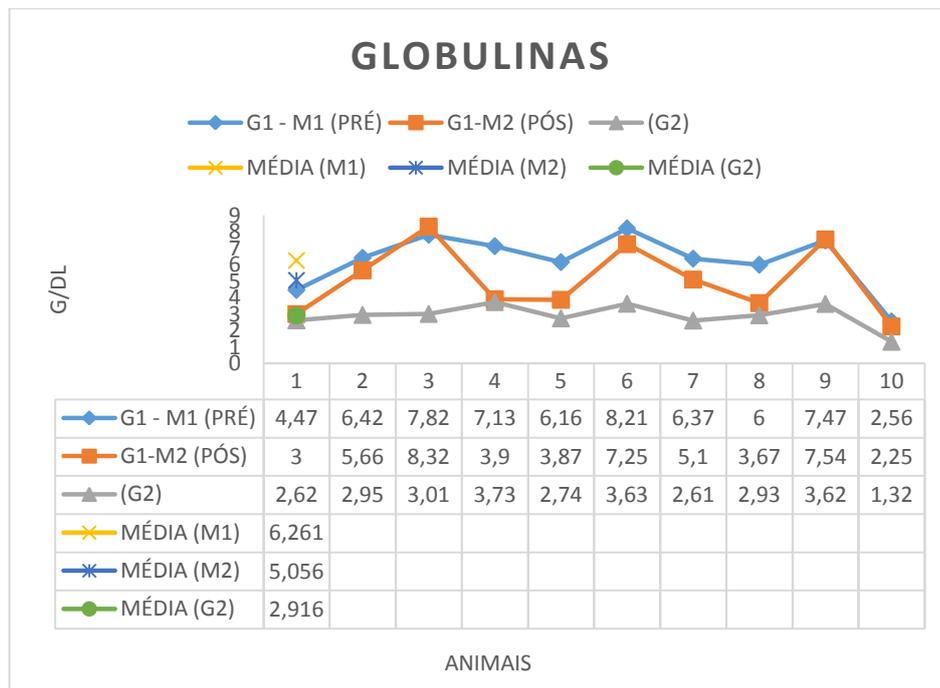
Houve diferenças estatísticas que geraram um aumento na média entre o pré e pós tratamento no exame bioquímico da albumina ($p= 0,0172$). As médias do pós tratamento e grupo controle (G2) permaneceram dentro das referências.

Foi constatado por Freitas et al. (2012) hiperproteïnemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. Segundo Noli (1999), a hipoalbuminemia pode ser secundária ao comprometimento hepático, ocorrendo também devido à proteinúria ou desnutrição nos casos de animais nefropatas e/ou anoréxicos.

Em casos em que a perda de proteínas é muito severa, como acontece no caso de hemorragias frequentes ou de diarreia severa, pode observar-se hipoproteïnemia, ao contrário do habitual em animais com leishmaniose (CIARAMELLA; CORONA, 2003).

No pré e pós tratamento, os valores médios das globulinas (Gráfico 5) apresentaram-se acima dos valores de referência e do grupo controle (G2). Houve diferenças estatísticas significativas que implicaram na diminuição da média das globulinas entre o pré e pós tratamento ($p=0,0097$).

Gráfico 5 Representação dos valores de globulinas nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias. Referências: 2.4-4.8 g/dL.



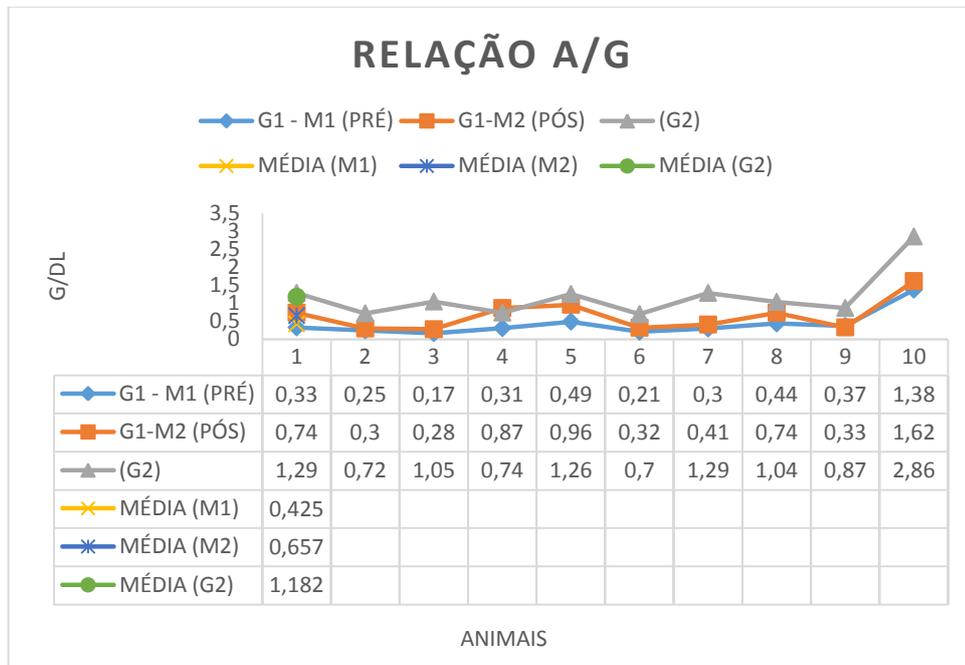
Os níveis de globulinas mesmo no pós tratamento encontraram-se com a média acima das referências, assim como no pré tratamento, caracterizando uma hiperglobulinemia corroborando ainda com Medeiros et al. (2008) e Freitas et al. (2012) que também encontraram em seus estudos uma hiperglobulinemia.

O achado clínico-laboratorial mais comum da LVC é a hiperglobulinemia, causada pela ativação das células policlonais e produção de anticorpos (NOLI, 1999; AMUSATEGUI et al., 2003).

4.4 Avaliação da relação albumina/globulinas

No pré tratamento (M1) a média dos valores encontrados estiveram abaixo da referência, já no pós (M2) a relação albumina/globulina (gráfico 6) mantiveram se dentro da referência para a espécie, assim como no G2.

Gráfico 6 Representação dos valores da relação A/G nos 10 animais (G1-M1) pré tratamento, (G1-M2) pós tratamento e no grupo controle (G2) juntamente com as médias. Referências: 0,5-1,7 g/dL



. Para o parâmetro relação (albumina/globulina), observou se diferenças estatísticas também entre o pré e pós tratamento ($p= 0,0022$) gerando um aumento na média da mesma.

Albumina e relação A/G aumentaram suas médias consideravelmente durante o tratamento enquanto as globulinas que estavam aumentada antes do tratamento decaíram, normalizando assim, a relação A/G.

Foi demonstrado que após o tratamento os valores estiveram dentro das referências. Um decréscimo na relação A/G pode estar presente devido a

hipoalbuminemia que pode ser causada por perdas renais, desnutrição e acometimento hepático (ALMEIDA et al., 2005; AMUSATEGUI et al., 2003).

5 CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo pode se concluir que o tratamento com a miltefosina proporcionou uma melhora no quadro hematológico dos animais e em decorrência disso, os animais melhoraram seu quadro clínico pois a maioria dos sinais eram decorrentes da anemia moderada. Os animais tratados com a droga obtiveram remissão dos sinais clínicos. O tratamento com a droga causou queda nos valores da enzima AST e não elevou ALT, não apresentando assim efeito hepatotóxico. No quadro renal avaliado com as dosagens de uréia e creatinina pode se concluir que a droga não apresentou efeitos nefrotóxicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, n. 1, p. 1-87, 2004.
- ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p.227-232, 2005.
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÍGUES, F.; TESOURO, M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v.18, n. 2, p.147-156, 2003.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BORDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 7, p. 324-330 2008.
- BORASCHI, C.S.S.; NUNES, C.M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n.71, p.44-48, 2007.
- BRAZ, P.H.; SARTONELA, M. C.; SOUZA, A. S.; MELO, F. M. G. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.1, p.87-90,2015.
- BUSH, B. M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. São Paulo. Roca, p.376, 2004.
- CARVALHO NETA, A.V., PAIXÃO, T.A., SILVA, F.L., SANTOS, R.L. **Panoftalmite em cão com leishmaniose visceral: relato de caso**. *Clínica Veterinária*, São Paulo, ano 12, n.66, p.52-56, 2007.
- CASTRO, I. P.; SOUSA M. V. C.; MAGALHÃES, G. M.; MUNDIM, A.V.; NOLETO, P. G.; PAULA, M. B. C.; PAJUABA NETO, A.A.; MEDEIROS, A.A. PERFIL HEPÁTICO E PROTÉICO EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 5. 799-804, Sept/Oct.2012.
- CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L.; PERO, M. E.; CORONA, M.; LOMBARDI, P.; AVALLONE, L.; PERSECHINO, A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 3, p. 465-467, 2005.
- CIARAMELLA, P. CORONA, M. (2003). **Canine leishmaniasis: therapeutic aspects**, *Compendium*, 25, 370-375.
- COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M.S.M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N. 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.

DIAS, C. A. **Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados no Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 82 p. Dissertação de Mestrado.

DIAS, E. L.; BATISTA, Z.S.; GUERRA, R.M.S.N.C.; CALABRESE, K.S.; LIMA, T.B.; ABREU-SILVA, A.L. Canine Visceral Leishmaniasis (Cvl): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão State, Brazil, **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 3, p. 740-745, 2008.

FELDMAN, B.V.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Canada: Lippincott Williams & Wilkins, 1344p., 2000.

FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LOPES NETO, B. E.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.

GEORGETTI, E.; D. S, SANTOS, H. D.; MINHARRO, S. **Alterações hematológicas em cães positivos para *Leishmania* spp. na microrregião de Araguaína-TO**. 9º Seminário de Iniciação Científica-UFT, 2013

TROTZ-WILLIAMS, L.; GRADONI, L. (2003). **Disease risks for the travelling pet: Leishmaniasis**, In Practice, 190-197.

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

IKEDA-GARCIA, F. A. FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico da Leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, v. 71, p. 34-42, 2007.

KIRAL, F.K.; SEYREK, K.; PASA, S. **Some Haematological, Biochemical and Electrophoretic Findings in Dogs with Visceral Leishmaniasis**. **Revue Médicine Vétérinaire**, v.155, n.4, p.226-229, 2004.

LAPPIN, M. R. **Infecções por protozoários e mistas**. In: ETTINGUER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 5ed. Rio de Janeiro: Manole, 2004. P. 437-438.

LUVIZOTTO, M.C.R. **Miocardite Associada a Leishmania sp em cão - Relato de caso.** In: 10 FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. Anais do Forum de Leishmaniose Visceral canina, 2006. p.48.

MAIA, C.; CAMPINO L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol.** 2008. Dec;158(4):274-87.

MATTOS JR, D. G.; PINHEIRO, J. M.; MENEZES, R. C. 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.

MEDEIROS, C. M. O.; MELO, A. G. C.; LIMA, A. K. F.; SILVA, I. N. G.; OLIVERIA, L. C. O.; SILVA, M. C. (Haematological profile of dogs with visceral leishmaniasis in the city of Fortaleza, Ceará). **Ciência Animal**, 18(1):43-50, 2008.

NOLI, C. **Leishmaniosis canine.** Waltham Focus, London, v.9, n.2, p.16-24, 1999.

OMS. 2015. **Leishmaniasis fact sheet no. 375.** World Health Organization, Geneva, Switzerland. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 28 de Jul 2017.

ORDEIX, L., SOLANO-GALLEGO, L., FONDEVILA, D., FERRER, L., FONDATI, A. 2005. Papular dermatitis due to Leishmania spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. **Veterinary Dermatology.** v. 16, p.187–191.

QUINNELL RJ, COURTENAY O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology.** 2009 Dec;136 (14):1915-34.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O., CORREA OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical / hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

SALZO, P.S. **Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina.** Nosso clínico, São Paulo, ano 11, n.63, p.30-34, 2008.

SOLANO-GALLEGO, S., KOUTINAS, A., MIRO, G., CARDOSO, L., FERRER, L., BOURDEAU, P., OLIVA, G., BANETH, G. 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology.** v.165, p.1-18.

TERRAZANO, G.; CORTESE, L.; PIANTEDOSI, D.; ZAPPACOSTA, S.; DILORIA, A.; ANTORO, D.; RUGGIEERO, G.; CIARAMELLA, P. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by Leishmania infantum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3-4, p. 331-337, 2006.

TIBAGY, R. N.; FRANCESCHETTI, F. G.; PENA, S. B.; NOGUEIRA, G. M. **Leishmaniose Canina - Relato De Caso.** 2005. Disponível em: <

<http://www.revista.inf.br/veterinaria05/anais/artigo19.pdf> >. Acesso em: 25, Abril, 2017.

VIRBAC BRASIL, 2016. Disponível em: <<https://br.virbac.com/home/espaco-leishmaniose.html>> Acesso em: 05 fev 17.

VISCHER, C., GROUSSON, D.; MÉDAILLE, C. (2007). **Preliminary safety study of the combination therapy of miltefosine and allopurinol in dogs [abstract]**. In Proceedings of the 32nd annual world congress of the World Small Animal Veterinary Association, Sydney, Australia, 19-23 August.