



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES (*Canis familiaris*) Linnaeus, 1758,
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) infantum*
chagasi (CUNHA E CHAGAS, 1937) SHAW, 2002, SUBMETIDOS A TRATAMENTO
EXPERIMENTAL

MARÍLIA DE ANDRADE SANTANA

RECIFE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES (*Canis familiaris*) Linnaeus, 1758,
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) infantum*
chagasi (CUNHA E CHAGAS, 1937) SHAW, 2002, SUBMETIDOS A TRATAMENTO
EXPERIMENTAL

MARÍLIA DE ANDRADE SANTANA

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE

2017

Ficha catalográfica

000a Santana, Marília de Andrade

Estresse oxidativo em cães (*Canis familiaris*) Linnaeus, 1758, naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) Shaw, 2002, submetidos a tratamento experimental. Recife, 2017.

XX f.: il.

Orientador: Leucio Câmara Alves.

Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2017.

Referências.

1. Leishmaniose Visceral Canina
 2. Bioquímica 3. Espécies de oxigênio reativo
- . Alves, Leucio Câmara, orientador II. Título

CDD 000.000000

MARÍLIA DE ANDRADE SANTANA

ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES (*Canis familiaris*) Linnaeus, 1758,
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) infantum*
chagasi (CUNHA E CHAGAS, 1937) SHAW, 2002, SUBMETIDOS A TRATAMENTO
EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como pré-requisito para
obtenção do grau de Mestre em Biociência
Animal.

Recife, 31 de Agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Leucio Câmara Alves (Orientador)
Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária- UFRPE

Dr^a Edna Michelly de Sá Santos
Professora Titular do Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Dra. Lorena Adão Vescovi Sellos da Costa
Técnica Veterinária no Departamento de Medicina Veterinária- UFRPE

Dr. Aleksandro Schafer da Silva
Professor adjunto do Departamento de Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina –
UDESC.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Nossa Senhora por iluminarem os meus caminhos percorridos até aqui;

Aos meus pais Mario Lino de Santana e Margarete Correia de Andrade Santana e ao meu Irmão Bruno Leonardo pela torcida, pelo amor e por todo suporte por eles dado;

A minha Vó Maria Maura que de alguma forma está sempre presente.

A minha amada Thais Moura de Freitas por toda força, dedicação dadas a mim e por todas as vezes em que senti meu coração aquecido

As minhas amigas Andréa Calado Medina, Ingrid Nascimento, Edna Michelly de Sá Santos, Maria Fernanda Monteiro, pelas palavras de incentivo, pela energia desprendida e muitas vezes pelo ombro amigo.

Ao Professor Leucio Câmara Alves pela oportunidade dada, pelos anos de convívio e por me instigar a ser cada vez mais uma profissional/pessoa melhor.

À todos os colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos (que são muitos!!!) aos residentes que estão na linha de frente, por toda a ajuda, e momentos de descontração;

A Nathielli Bottari (UFSM) pela ajuda imprescindível nesse trabalho;

Aos animais que participaram do experimento, por me mostrarem que mesmo sendo difícil, as coisas se tornam possíveis com amor e dedicação. Levo deles além do aprendizado científico, uma mensagem pessoal de esperança.

E a todos que contribuíram de alguma forma na minha formação. Muito obrigada à todos!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
REVISÃO DE LITERATURA	10
Leishmaniose Visceral (LV)	10
Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	12
Distribuição da LVC no Brasil	12
Imunopatogenia da LVC	13
Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).....	15
Substâncias Reativas ao Ácido Barbitúrico	16
Sinais clínicos da LVC	17
Diagnóstico da LVC	19
Tratamento da LVC	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO I - Estresse oxidativo em cães (<i>canis familiaris</i>) (linnaeus, 1758) naturalmente infectados com <i>leishmania (leishmania) infantum chagasi</i> (cunha e chagas, 1937), submetidos a tratamento experimental.	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença infecciosa, crônica e sistêmica, causada no Brasil por um protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, sendo transmitida por insetos hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, por ocasião do repasto sanguíneo. É considerada uma doença imunomediada devido a característica do parasito além disso, o estresse oxidativo vem sendo estudado como um dos fatores envolvidos na imunopatogenese da doença. Diante disso, nesse estudo foram avaliados os níveis séricos de Espécies Reativas ao Oxigênio (ERO's) de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* no Momento zero (M0), e no Momento três (M3). 63,6% dos animais apresentaram diminuição dos níveis séricos de ERO's depois de 3 meses de tratamento, os cães desse grupo também apresentaram visível melhora clínica. Em 36,4% dos animais, esses níveis de ERO's permaneceram-se altos e os pacientes não demonstraram melhora clínica.

ABSTRACT

Visceral Canine Leishmaniasis (LVC) is a chronic and systemic infectious disease caused in Brazil by a protozoan of the *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* species, and is transmitted by blood-sucking insects of the species *Lutzomyia longipalpis*, on the occasion of blood repellent. It is considered an immunomediated disease due to the characteristic of the parasite. In addition, oxidative stress has been studied as one of the factors involved in the immunopathogenesis of the disease. In this study, the serum levels of Oxygen Reactive Species (EROs) of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* at Moment zero (M0), and at Moment three (M3) were evaluated. 63.6% of the animals showed a decrease in serum ERO levels after 3 months of treatment, the dogs in this group also showed visible clinical improvement. In 36.4% of the animals, these ROS levels remained high and the patients did not show clinical improvement.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de distribuição mundial comum em regiões tropicais, subtropicais e mediterrâneas (PIRAJÁ, 2013) transmitido aos hospedeiros susceptíveis por vetores flebotomíneos (OLIVEIRA, 2008) do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* no velho e novo mundo respectivamente (QUINNEL e COURTENAY, 2003).

No Brasil a LV é causada pelo protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (NOLI, 2008; DANTAS-TORRES, 2006), sendo sua transmissão realizada principalmente por flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* por ocasião do repasto sanguíneo (DANTAS-TORRES, 2006), tendo o cão um papel importante nas áreas urbanas por ser considerado o principal reservatório do parasito (ALMEIDA, 2009; DANTAS-TORRES et al, 2012; VITORIANO-SOUSA et al, 2013).

Considerada como doença imunomediada (BANETH, 2006; MAIA & CAMPINO, 2008), a progressão da infecção nos cães apresenta acentuada resposta humoral com altos títulos de imunoglobulinas e depressão da resposta imunológica celular (MAIA & CAMPINO, 2008; CARRILLO & MORENO, 2009), determinando o surgimento de animais assintomáticos ou sintomáticos (MOLINA, 1994).

Neste sentido, a ativação exacerbada do sistema imune durante a infecção por *Leishmania (L.) infantum chagasi* tem sido responsabilizada por diversas síndromes associadas a infecção como doença articular, renal, ocular entre outras (SOLANO-GALEGO et al, 2009).

Por outro lado, as células lesadas liberam substâncias que participarão diretamente do processo inflamatório e influenciam de maneira concreta no estado de oxidação celular e na liberação de radicais livres deletérios aos processos fisiológicos.

Nesse sentido, as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) assumem importante papel no metabolismo respiratório durante a fagocitose, promovendo a destruição dos antígenos, porém, quando estimulados em excesso, aumentam a produção dessas espécies reativas,

promovendo um distúrbio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes (ZAMZAMI, 1996, BILDIK, 2004; EREL, 1997; OLIVEIRA & CECHINI, 2002).

Independentemente do tipo de resposta e fase clínica dos cães infectados, o tratamento de animais infectados com *Leishmania (L.) infantum chagasi* tem sido utilizado para remissão dos sinais clínicos, redução na capacidade infectante (CIARLINI et al ,2010; TRIGO, 2010) e diminuição da produção dessas espécies reativas, promovendo o equilíbrio do eixo (TONIN et al, 2016).

Sendo assim, as condutas terapêuticas utilizados na doença canina estão baseadas utilização de antimoniato de meglumine, anfotericina B, alopurinol e imuno moduladores, as quais tem demonstrado cura clínica, sendo que a eleição de um fármaco específico depende do quadro clínico do animal e do *status* imunológico do animal e do país onde os animais residem(SOLANO-GALEGO, 2009).

Devido a estreita relação entre o parasito e a resposta imune, e sabendo da importância das enzimas chaves na imunopatogênese da LVC, este trabalho tem como objetivo avaliar o estresse oxidativo e atuação de enzimas do sistema purinérgico em cães, naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum chagasi*, submetidos a tratamento experimental

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) se apresenta entre as mais importantes doenças negligenciadas, estando associada vulnerabilidade ambiental e social, constituindo um grave problema de saúde pública devido a sua distribuição geográfica, com o agravante de que 350 milhões de pessoas possam estar sob risco direto de exposição a doença e com mais de dois milhões de casos registrados anualmente (WHO, 2016).

Considerada uma zoonose crônica, a LV é causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (LAINSON e SHAW, 1987) encontrada principalmente na Índia, Paquistão e Bangladesh e *L. infantum*, encontrada no Brasil, alguns países do Mediterrâneo, África Oriental, norte da Ásia e da China (DANTAS-TORRES, 2006), acometendo o homem e diferentes espécies de mamíferos silvestres e domésticos (CASTELLANE, 2012), cuja transmissão ocorre através da picada de insetos vetores (CORTES et al., 2012) da família *Psychodidae*, (MARTINS et al., 1978; TAFURI et al., 2004).

No Brasil, após a inoculação por insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis* nos hospedeiros vertebrados, a forma promastigota de *Leishmania infantum* é rapidamente fagocitada pelas células do sistema fagocítico mononuclear (MURRAY, 2005), onde os leucócitos parasitados migram progressivamente da pele através das vias linfáticas ou sanguíneas (LAGE, et al, 2007) para outros órgãos tais como: baço, medula óssea, fígado, causando uma infecção crônica (SILVA, 2007).

A ocorrência da LV em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível. No Brasil inicialmente, a LV foi caracterizada como doença rural e nos últimos anos vem se tornando uma doença urbanizada em várias cidades brasileiras (BEVILACQUA et al., 2001; DESJEUX, 2004).

Neste contexto os cães domésticos são considerados, no ciclo urbano de transmissão, os principais reservatórios (DEANE & DEANE, 1962 ; ALENCAR 1978) e o papel dos gatos domésticos nestas áreas tem sido discutido (PIRAJÁ, 2013).

2.2 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

A LVC é uma doença complexa, sistêmica, crônica e até mesmo fatal, caracterizada por alterações clínicas muito variáveis, envolvendo quase todos os órgãos, em consequência da multiplicidade de mecanismos patogênicos do protozoário, da diversidade de respostas imunológicas desenvolvidas nos hospedeiros e do longo período de incubação, que pode variar de alguns meses até vários anos (BANETH, 2006).

Não obstante é amplamente aceito que animais infectados com sinais clínicos da enfermidade apresentem uma acentuada resposta humoral, e uma baixa imunológica celular contra o parasita (MAIA & CAMPINO, 2008 ; CARRILLO & MORENO, 2009). Desta forma as respostas imunes e manifestações clínicas na LVC podem ser apresentadas como uma infecção subclínica, uma doença auto-limitante ou doença grave (BOTERRO et al, 2006).

Apesar de alguns fatores de riscos apresentar associação com doença canina como sexo, faixa etária, raça, tamanho e condições do peridomicílio, a maior incidência da doença parece estar associada a presença de cães em áreas com condições sanitárias precárias e em locais próximos a vegetação primária, além do convívio com animais silvestres infectados (FIGUEREDO, 2014).

No Brasil, estima-se em milhões o número de cães infectados (BANETH et al. 2006) em função da prevalência da infecção que varia de 1,9% a 51,35% em diferentes regiões (REIS et al, 2006, DANTAS-TORRES 2006, MORAIS, 2013).

2.3 Distribuição da LVC no Brasil

A Ocorrência da LVC tem sido registrada em vários estados da federação com diferentes taxas de prevalência na dependência da endemicidade local, da região estudada e do teste diagnóstico utilizado.

Sendo assim a prevalência da infecção varia de 0,57% cidade de São José do Rio Preto (ANDRADE et al., 2007) a 45% na zona urbana da cidade de Mossoró-RN, (AMORÁ et al., 2006).

No estado de Pernambuco, a frequência da infecção tem revalidado índices não muito distantes daqueles evidenciados no território brasileiro com taxas variando de 4,8% no município de São Vicente Ferrer, Agreste Pernambucano a 40,3% na cidade de Paulista, Região Metropolitana do Recife (DANTAS-TORRES e BRANDÃO FILHO, 2006).

2.4 Imunopatogenia da LVC

Após a inoculação, as formas promastigotas podem ser fagocitadas pelos polimorfonucleares (WOODMAN et al, 1998), onde pode ocorrer a destruição dos parasitas, pela ação de enzimas e seus grânulos (CASTELLANO, 2005), além da ação de produtos do metabolismo oxidativo e produção de óxido nítrico (AWASTHI et al., 2004).

Em função do limitado poder de fagocitose do sistema mieloide, as formas amastigotas de *L. infantum* continuam a se replicar no interior dos macrófagos (LAGE et al., 2007) ocorrendo assim a disseminação dos protozoários para os órgãos do sistema retículo-endotelial (RIBEIRO,2008), além de outros sítios, incluindo estômago, intestino e pulmão (SILVA, 2007).

Desta forma os antígenos processados dentro dos macrófagos são apresentados às células T CD4+, que determinarão uma resposta do tipo Th1 ou Th2, na dependência da espécie de parasita, a dose inoculada, o local de inoculação, a saliva de algumas espécies de flebotomíneos, aspectos imunológicos e predisposição genética do hospedeiro pode influenciar essa resposta (SEDER & PAUL, 1994; REIS et al., 2006).

Neste sentido a imunopatogênese da LVC é dependente do perfil de resposta imunológica associada ao perfil de subpopulações celulares Th1 e Th2 (REGUERA, 2016). Neste sentido cães infectados apresentam uma falha na resposta linfoproliferativa e uma redução no número de células T CD4+ (BOURDOISEAU, 1997; MORENO et al, 1999; GUARGA et al, 2002)

Por outro lado, durante o processo de infecção, a saliva do vetor é importante no estabelecimento da infecção, pois contém componentes imunossupressores (RIBEIRO, 2008) que promovem, redução da produção de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), redução da apresentação de antígeno pelo macrófago (HALL & TITUS, 1995; TITUS & RIBEIRO, 1990; TITUS e THEODOS, 1994), indução da produção de Interleucina 4 (IL-4) por linfócitos (LIMA e TITUS, 1996), inibição da instalação da resposta Th1 (MBOW et al.,1998) e redução na expressão de moléculas co-estimulatórias das células apresentadoras de antígeno (APCs) (THEODOS e TITUS, 1991).

Além disso, os macrófagos infectados por *Leishmania* spp são deficientes em moléculas co-estimulatórias, o que leva a um comprometimento da interação com as células T e consequente inibição de uma resposta imune efetora com produção de IFN- γ que induz a ativação macrofágica (PINELLI et al., 1999), e a participação de linfócitos T CD8+ que parecem atuar na resposta protetora contra a infecção (REIS, 2006).

Apesar do papel dos macrófagos ser bem pontuado, sabe-se que a primeira linha celular de defesa são os neutrófilos, recrutados por Interleucina 8 (IL-8), Interleucina 17 (IL-17), complemento C3a, fator de necrose tumoral (TNF), fator quimiotático secretado por promastigotas (VAN ZANDBERGEN, 2002), chegando durante as primeiras horas ao local de inoculação das formas promastigotas (SOLANO-GALEGO, 2009) com a função de fagocitar o protozoário.

Neste processo, o protozoário induz a diminuição da apoptose induzida via Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e fator estimulador de granulócito e macrófago (MOORE & MATLASHEWSKI, 1994).

Conforme já demonstrado, os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do organismo, realizando fagocitose do agente invasor. e destruindo-o por meio da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), entrando posteriormente em apoptose. Entretanto, alguns micro-organismos desenvolveram a capacidade de modificar o metabolismo oxidativo e a apoptose neutrofílica como tática para perpetuar a infecção, evadindo de forma eficaz o sistema imune (ANWAR, 2007).

2.5 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Espécies Reativas de Oxigênio são espécies químicas presentes na maioria dos sistemas biológicos, que ocorrem naturalmente em grande parte das células eucarióticas devido ao metabolismo energético dependente do uso de oxigênio. Na cadeia transportadora de elétrons, localizada na membrana interna da mitocôndria, o O_2 recebe quatro elétrons e quatro prótons resultando na formação de duas moléculas de H_2O . A redução parcial de oxigênio por adição de um elétron de cada vez, gera intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LEITE, 2003; NASSER et al, 2011).

Em condições naturais os seres vivos mantem um equilíbrio entre a produção e a neutralização das ERO (WELKER et al., 2013). Entretanto, quando a taxa de produção de ERO excede a capacidade da defesa antioxidante, uma situação de estresse oxidativo pode se estabelecer (ZAMZAMI, 1996, BILDIK, 2004; EREL, 1997; OLIVEIRA e CECHINI, 2000), gerando à oxidação de componentes essenciais da célula como proteínas, DNA e ácidos graxos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

As Espécies Reativas de Oxigênio são também componentes importantes no metabolismo respiratório durante a fagocitose, e nessa ocasião, possuem potente ação microbicida, promovendo a destruição dos antígenos englobados (ALMEIDA, 2013).

Por outro lado, a produção contínua desses radicais livres durante os processos metabólicos e fagocitose, culmina no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, que têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (LASKAY, 2003), como a apoptose prematura dos fagócitos e deficiência da resposta imune inata (VALKO, 2006).

Na espécie canina, o estresse oxidativo vem sendo atribuído à patogênese de várias doenças parasitárias particularmente infecções por *Hepatozoon canis*, *Leishmani chagasi*, *Babesia gibsoni* e *B. canis* (KIRAL et al., 2005; BRITTI et al., 2008; CHAUDHURI et al. 2008; CRNOGAJ et al., 2010).

O aumento na formação de ERO nestas enfermidades conduz o organismo um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes, surgindo então o estresse oxidativo, acarretando à oxidação de biomoléculas com perda de suas funções biológicas ou modificação de macromoléculas celulares, com morte celular (LYKKESFELDT & SVENDSEN, 2007; BARBOSA et al., 2010).

Na leishmaniose visceral canina, o aumento da produção de superóxido pode conduzir a formação do estresse oxidativo nesses animais, uma vez que já foi demonstrada a relação entre os fagócitos e o estresse oxidativo (BABIOR, 2000), estando deste modo envolvido na patogênese da anemia observada em cães infectados, em que ERO lesionam membranas celulares eritrocitárias causando peroxidação lipídica e predispondo as células à apoptose (NEUPANE et al., 2008; SAMANTA et al., 2012).

Frente aos danos promovidos pelo estresse oxidativo, as células dos organismos vivos possuem um sistema de defesa para a superoxidação e produção de radicais livres, chamado de Sistema Antioxidante (SIES & STAHL, 1995; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007)

Os antioxidantes podem ser de origem endógena, quando são produzidos no próprio organismo e dividem-se em enzimáticos (glutaciona peroxidase, superóxido desmutase e catalase) e não enzimáticos (glutaciona, peptídeos de histidina, ubiquinona, bilerrubina e outros), ou podem ser de origem exógena como no caso da vitamina E, β -6 carotenos, flavonóides, curcumina, polifenóis, taninos, entre outros, que são obtidos pela alimentação (ALMEIDA, 2013).

2.6 Substâncias Reativas ao Ácido Barbitúrico

Todas as organelas celulares podem sofrer alterações quando interagem com as EROs, porém, a membrana celular é a estrutura que, se atingida, desencadeia um maior dano celular, pois resulta na peroxidação lipídica, modificando a sua estrutura e, quando submetido ao calor ou hidrólise, leva a formação de malonaldeído (MDA) e a outros produtos finais (ALMEIDA, 2013). Esse processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, comprometendo todo o metabolismo celular. (FERREIRA, 1997)

O aumento da peroxidação lipídica é observada em algumas doenças desempenhando um papel importante como, por exemplo, na patogênese da anemia observada na infecção por *Leishmania (L.) infantum chagasi* (BILDIK, 2004; CIARLINI, 2010).

2.7 Sinais clínicos da LVC

Como a LVC é considerada uma doença imunomediada a progressão dos sinais clínicos ocorre em um intervalo de meses a vários anos (FERRER, 1999; CIARAMELA & CORONA, 2003). Neste sentido, os cães com LV apresentam uma doença multissistêmica e podem apresentar quadros clínicos variados desde aparente estado sadio a um severo estágio final (FERRER, 1999).

As apresentações clínicas incluem perda de peso progressiva acompanhada de astenia, apatia e em casos extremos anorexia que caracterizam uma síndrome geral inespecífica, de instalação lenta e evolução progressiva (MARQUES, 2008).

As dermatopatias são as manifestações clínicas mais frequentes na LVC (ORDEIX et al, 2005; SOLANO-GALLEGO, 2004; SILVA, 2007), sendo a dermatite descamativa a alteração mais comum, reportada entre 56 a 91% dos casos (QUEIROZ, 2010), além de alopecia não pruriginosa, úlceras indolores geralmente localizadas na cabeça ou membros, dermatite pustular estéril, dermatite nodular mucocutânea e onicogribose. (ORDEIX et al , 2005).

As alterações oculares particularmente a ceratoconjuntivite, blefarite, inflamação mononuclear- plasmocitário do trato uveal, conjuntivite, exoftalmia, corrimento e panoftalmia são bastante relatadas na LVC (BRITO, 2004; COUTINHO, 2005; FREITAS, 2012).

As lesões renais são a principal causa de óbito na LVC (RIBEIRO, 2008) em função da glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial (ALBUQUERQUE, 2008), causada pela deposição de imunocomplexos nos glomérulos (BANETH, 2006) e infiltrado de LTCD4+ (COSTA, 2000) respectivamente.

A insuficiência renal pode estar presente em cães sem os sinais clássicos sistêmicos de LVC. A presença persistente de proteína na urina pode levar ao aparecimento de sinais

clínicos compatíveis com síndrome nefrótica, tais como hipoalbuminemia, ascite, edema periférico e hipercolesterolemia (MARQUES, 2008).

Outros sinais como diarreia (SILVA et al., 2005; LUVIZOTTO, 2006), epistaxe (MORENO et al., 1998) e anemia (KOUTINAS et al., 1999) também tem sido descritos.

2.8 Diagnóstico da LVC

O diagnóstico da LVC é geralmente realizado por duas razões principais: para a confirmação da doença em animais que apresentem sinais clínicos compatíveis com a enfermidade, e para investigar a presença da infecção em cães clinicamente saudáveis provenientes de regiões endêmicas (MIRÓ, 2008).

Dentre as formas de diagnóstico da doença, o teste “padrão ouro” é a detecção do parasita através de punção aspirativa da medula óssea, linfonodos, baço, fígado, além da citologia esfoliativa da pele íntegra e/ou lesionada (GOMIDE, 2005) (MOREIRA, 2002). Esses exames apresentam alta especificidade demonstrando-se seguros quanto à positividade dos casos, porém, possuem baixa sensibilidade. (ALVES e BEVILACQUA, 2004)

Entre os métodos sorológicos destaca-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), Fixação do Complemento (FC), Teste de Aglutinação Direta (TAD) (BRASIL, 2006) Imunoelektroforese (FEITOSA, 2000).

Atualmente, existem testes rápidos para diagnóstico da LVC comercializados para uso em ambulatórios. O teste rápido oferecido pelo estado por meio da Biomanguinhos/Fiocruz é baseado em ensaio imunocromatográfico denominado de “Dual-Path Platform” (DPP), o qual se mostrou eficaz e com alta especificidade para diagnóstico da LVC em cães sintomáticos (GRIMALDI, 2012).

Dentre estas técnicas moleculares têm-se destaque a Reação da Cadeia em Polimerase (PCR). Quanto a utilização da PCR em estudos epidemiológicos (SOLANO-GALLEGO et al, 2004), afirmam que a prevalência da LVC é muito maior do que observado anteriormente pelos testes sorológicos.

A PCR em tempo real permite quantificar a carga parasitária apresentada pelo animal, e tem sido utilizada também como meio de diagnóstico (FRAGA, 2014).

2.9 Tratamento da LVC

Atualmente são utilizadas várias drogas na terapêutica da LVC, não só como tratamento etiológico, mas também sintomático (MEIRELES, 2008). São usados fármacos ativos contra *Leishmania spp.*, moduladores do sistema imunitário (imunossupressores e imunostimulantes) e medicamentos de apoio para controlar as complicações secundárias à doença (MEIRELES, 2008).

Dentre as fármacos indicadas, destacam-se o antimoniato de n-metilglucamina, alopurinol, combinações dos dois, anfotericina B convencional ou encapsulada em lipossomas, o sulfato de aminosidina, alopurinol, pentamidina e, recentemente, a miltefosina (ALVAR et al. 2004; MIRÓ 2008; NOLI & AUXILIA 2005; SALZO, 2008). Muitos protocolos apresentam significativa porcentagem de sucesso em redução dos sinais clínicos, mas não existe cura parasitológica dos animais tratados (BANETH, 2006; SALZO, 2008)

Apesar do antimoniato de meglumina (AM) e o stibogluconato de sódio serem os fármacos de eleição no tratamento da leishmaniose visceral canina na Europa e em outras partes do mundo (BANETH & SHAW 2002; MIRÓ 2008; NOLI & AUXILIA 2005).

Este fármaco tem sua distribuição e uso restrito ao serviço público de saúde, destinado ao tratamento humano, não podendo ser utilizado sob condição alguma para o

tratamento da LVC (BRASIL, 2006). Diante desse contexto, outros fármacos e associações tem sido empregado em tratamento de animais com LVC.

A anfotericina B tem sido considerada fármaco de segunda linha para o tratamento da LVC em vários países (LEMKE et al. 2005), mas apresenta nefrotoxicidade. De modo similar aos antimoniato é de uso restrito ao serviço público de saúde no Brasil.

A aminosidina, antibiótico aminoglicosídeo apresenta ototoxicidade e a nefrotoxicidade (NOLI & AUXILIA 2005), e por isso seu uso não tem sido recomendado.

O alopurinol, análogo estrutural da hipoxantina, apresenta efeito leishmanioestático (MORITZ, 1999), sendo utilizado em diversos protocolos no Brasil, levando-se em conta o estado geral do paciente.

Um novo medicamento tendo com base miltefosina aparece como importante alternativa aos protocolos já estabelecidos para o tratamento da LVC (WOERLY & MAYNARD, 2009). Além de ser leishmanicida, estimula a produção de células T auxilia na ativação dos macrófagos. Atua também na inibição da síntese da membrana plasmática do protozoário.(ANDRADE, 2011).

3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, B. C. N. C., MAIA, F. C. L., SILVA JÚNIOR, V. A., LIMA, A. M. A., ALBUQUERQUE, E. R. C., PIMENTEL, D. de S., ALVES, L. C., Alterações estruturais em rins de caninos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 3-5, 2008.

ALENCAR J.E. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista de Medicina da Universidade do Ceará**. v.17 n.18, p.129- 148. 1978.

ALMEIDA, A.B.P.F. Inquérito soropidemiológico da Leishmaniose Canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado do Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.42, n.2, 2009.

ALVES, W. A., BEVILACQUA, P. D., Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997, **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

AMÓRA, S. S.A., et al. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em áreas endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1854-1859, 2006.

ANDRADE, A. M., et al. Reposição de cães em áreas endêmicas para leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.5, p.594-595, 2007.

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

ANWAR, S.; WHYTE, M.K.B. Neutrophil apoptosis in infectious diseases. **Experimental Lung Research**, v.33, n.10, p.519-528, 2007.

ALBUQUERQUE, B. C. N. C., MAIA, F. C. L., SILVA JÚNIOR, V. A., LIMA, A. M. A., ALBUQUERQUE, E. R. C., PIMENTEL, D. de S., ALVES, L. C., Alterações estruturais em rins de caninos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 3-5, 2008.

ALMEIDA, B.F.M.; Estresse oxidativo na leishmaniose visceral canina. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. 2013.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.;MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology Journal**. v.57, p.1-88. 2004.

AWASTHI, A., MATHUR, R.K., SAHA, B.; Immune response to Leishmania infection. **Indian Journal of Medicine Research**. v.119, p.238–258. 2004.

BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **The Journal of Clinical Investigation**, v.52, p.741-744, 1973.

BANETH, G.; SHAWB, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. v.106 p.315–324, 2002.

BANETH, G. Infectious Diseases of the Dog and Cat. Quarta edição, p. 685–698, **Saunders/Elsevier**. 2006

BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B., ALFENAS, R.C.G., DE PAULA, S.O., MINIM, V.P.R., BRESSAN, J.; Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*. v.23, p.629-643. 2010.

BEVILACQUA PD, PAIXÃO HH, MODENA CM, CASTRO MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.53, n.1, p.1-8. 2001.

BILDIK, A., KARGIN, F., SEYREK, K., PASA, S., O ZENSOY, S., Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**. v.77, p.63–66. 2004.

BOTTERO, E., POGGI, M., VIGLIONE, M. Lesioni papulari indotte da *Leishmania spp* in 8 Cani Giovani. **Veterinaria**.v.1, p. 33–36. 2006.

BOURDOISEAU G, BONNEFONT C, MAGNOL JP, SAINT-ANDRE I, CHABANNE L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.56, n.3- 4, p. 345-51, 1997.

BRASIL, 2006. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral, **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Departamento de Vigilância epidemiológica. Brasília, 2006).

BRITO, F. L. C., ALVES, L. C., ORTIZ, J. P. D., MAIA, F. C. L., SILVA JUNIOR, V. A., LAUS, J. L., Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from Olinda city, Pernambuco, Brazil, **Ciência Rural**, v. 34, p. 925-929, 2004.

BRITTI, D., SCONZA, S., MORITTU, V.M., SANTORI, D., BOARI, A., Superoxide dismutase and Glutathione peroxidase in the blood of dogs with Leishmaniasis. **Veterinary Research Communications**. v.32, p.251-254. 2008.

CARRILLO, E., MORENO, J., Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.128, p.67–70. 2009

CASTELLANO L.R., FILHO D.C., ARGIRO L., DESSEIN H., PRATA A., DESSEIN A., RODRIGUES V.; Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. **Human Immunology**. v.70, p.383-390. 2009.

CHAUDHURI, S., VARSHNEY, J.P., PATRA, R.C.; Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. **Research in Veterinary Science**. v.85, p.120–124. 2008.

CIARAMELA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, n. 5, p. 358-369, 2003.

CIARLINI, P.C.; VALADARES, T.C.; IKEDA-GARCIA, F.A.; MARCONDES, V.; LIMA, V.M.F.; Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol. **Ciência Animal Brasileira**. v. 11, n. 2, p. 369-375, 2010.

CORTES, S.; VAZ, Y.; NEVES, R.; MAIA, C.; CARDOSO, L.; CAMPINO, L.; Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Veterinary Parasitology**. v. 189, n. 2-4, p. 189-196, 2012.

COSTA, F. A. I. CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1455- 1458, 2000.

COUTINHO, M. T. Z., BUENO, L. L., STERZIKA, A., FUJIWARA, R. T., BOTELHO, R. J., MARIA, De M., GENAROA, O., LINARDIA, P. M., Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis, **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.

CRNOGAJ, M., R. PETLEVSKI, V. MRLJAK, I. KIS, M. TORTI, N. KUCER, V. MATIJATKO, I. SACER, I. STOKOVIC (2010): Malondialdehyde levels in serum of dogs infected with *Babesia canis*. **Veterinary Medicine**. v.55, p.163-171.2010.

DANTAS-TORRES, F., SOLANO-GALLEGO, L., BANETH, G., RIBEIRO, V.M., DE PAIVA-CAVALCANTI, M., OTRANTO, D.; Canine leishmaniasis in the old and new worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**. v.28, p.531–538, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** , v.39 n.4, p.352-356, 2006

DEANE LM , DEANE L.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.4: p.198-212. 1962.

Desjeux, P.; Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Compendiums of Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v.27, p.305–318.2004.

EREL, O., KOCYIGIT, A., AKTEPE, N., AVCI, S., Leukocyte adenosine deaminase, superoxide dismutase activities and lipid peroxidation in cutaneous Leishmaniasis. **Acta Parasitologica Turcica** v.21, p.160– 162. 1997

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**, v.28, p.36-44, 2000.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Proceedings of a canine Leishmaniasis. **Forum**.Barcelona, Spain, p 6-10, 1999.

FIGUEIREDO, M.J.F.M.; SOUZA, N.F.; FIGUEIREDO, H.F. MENESES, A.M.C.; FILHO, E.S.; NASCIMENTO, G.G.; Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal Brasileira**. v.15, n.1, p.102-106, 2013.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.43(1), p. 61-8. 1997.

FRAGA, D.B.M.; SILVA, E.D.; PACHECO, L.V.; BORJA, L.S.; OLIVEIRA, I.Q.; COURA-VITAL, W.; MONTEIRO, G.R.; OLIVEIRA, G.G.S.; JERÔNIMO, S.M.B. REIS, A.B.; VERAS, P.S.T. A multicentric evaluation of the recombinant *Leishmania infantum* antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasites & vectors** . v7, p.136. 2014.

FREITAS, JCC, NUNES-PINHEIRO DCS, NETO BEL, SANTOS GJL, ABREU, CRA, BRAGA, RR, CAMPO RM, OLIVEIRA, LF. Clinical na laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.45, n.1, p.24-29. 2012

GOMIDE, A. P.; Leishmaniose visceral canina: Reflexões sobre a opção do tratamento. **Monografia**. (Especialização em Clínica Médica de Pequenos Animais). Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Betim, 2005.

GRIMALDI, G. et al.; Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.106 p.54– 59, 2012.

GUARGA, J. L.; MARENO, J.; LUCIENTES, J.; GARCIA, M. J.; ANGEL, P. M. Evaluation of aspecific immunotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 1-2, p. 13-20, 2002.

HALL, L. R., TTUS, R. G., Sand fly vector selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. **Journal of Immunology**, vol. 155, p. 3501-3506, 1995.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 5ª edição, p.880, 2015.

KIRAL F., KARAGENC, T., PASA, S., YENISEY, C., SEYREK, K., Dogs with Hepatozoon canis respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. **Veterinary Parasitology**. v.131, p.15- 21. 2005.

KOUTINAS, A. F.; Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, p. 376-383, 1999.

LAGE, R.S.; OLIVEIRA, G.C.; BUSEK, S.U.; GUERRA, L.L.; GIUNCHETTI, R.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B.; Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1 - 2, p. 135-145, 2007.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210-214, 2003.

LEITE, H.P.; SARNI, S.S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A.; KAYSER, O.; Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.68, p.151- 162. 2005.

LIMA, H.C., TITUS, R.G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infection and Immunity** v.64: p.5442-5445. 1996.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: I Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina, Jaboticabal. **Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. p. 15 – 22. 2006.

LYKKESFELDT, J., SVENDSEN, O., Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. **The Veterinarian Journal**. v.173, p.502–511. 2007.

MAIA, C. & CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**. n. 4, v. 158, p. 274–287, 2008.

MARQUES, M.I.L.M; Leishmaniose canina – **Dissertação** de mestrado integrado em Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, 2008.

MARTINS,A.V.,WILLIAMS, P., FALCÃO,A.L.;American Sand Flies (*Diptera: Psychodidae: Phlebotominae*). **Editora da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro. p.195. 1978.

MEIRELES, J.A.F.S. – Terapêutica e profilaxia da Leishmaniose Canina – Leishmaniose canina – **Merial**, 2008).

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitology**. v.24, p.371–377, 2008.

MOORE, K. J., MATLASHEWSKI, G., Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis, **Journal of Immunology**, v. 152, p. 2930-2937, 1994.

MORAIS AN, SOUSA MG, MEIRELES LR, KESPER N JR, UMEZAWA ES. Canine visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaína, Tocantins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.22, n.2, p.225-9. 2013.

MORENO J, NIETO J, CHAMIZO C, GONZALEZ F, BLANCO F, BARKER DC.,The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after,

- chemotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.71, p.3-4, p.181-95. 1999.
- MORENO, P., et al. Evaluation of primary haemostasis in canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v. 142, p. 81-83, 1998.
- MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; NUNES, C.M.; SILVA, T.C.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P.; Application of direct immunofluorescence technic for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in lymph nodes aspirate. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.39,n.2. p.103-6. 2002.
- MORITZ, A.; Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**. v. 23, n. 6, p.279-283, 1999.
- MURRAY, H. W. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 174, p. 4916-4923, 2005.
- NASSER, A.L.M. ; DOURADO, G.K.; MANJATE, D.A. ; CARLOS, I.Z.; CESAR, T.B. Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.32, n.2, p.275-279.2011.
- NEUPANE, D.P.; MAJHI, S.; CHANDRA, L.; RIJAL, S.; BARAL, N. Erythrocyte glutathione status in human visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.23, n.1, p.95-97, 2008.
- NOLI, C.; AUXILIA, S.T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**. v.16 p.213–232, 2005.
- NUNES, M,M,C. ;CAMPINO, L. Importance of cat in zoonotic leishmaniasis in Portugal. **Vector Borne Zoonotic Disease**. v.8, p.4; p.555, 2008.
- OLIVEIRA, F.J.A., CECHINI, R., Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. **Journal of Parasitology**. v.86, p.1067–1072. 2002
- OLIVEIRA, F.J.A.; CECHINI, R. Oxidative stress of liver in Hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. **Journal of Parasitology**, v.86, n.5, 1067-1072, 2000.
- OLIVEIRA, T. M. F. S., FURUTA, P. I., DE CARVALHO, D., MACHADO, R. Z., A study of cross- reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test, **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.
- ORDEIX, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDEVILA, D.; FERRER, L.; FONDATI, A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. **Veterinary Dermatology** v.16 p.187–191, 2005.
- PINELLI E, RUTTEN VP, BRUYSTERS M, MOORE PF , RUITENBERG EJ. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and Immunity**. v.67 n.1, p.237-43. 1999.

PIRAJÁ, G.V. DA SILVA, D.T.; PERUCA, L.C.B.; ALVES, M.F.; PAIXÃO, M.S.; LUCHEIS, S.B.; SANTOS, W.S.; GUIRALDI, L.M.; Leishmaniose Felina: Revisão de Literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.2, p.203-216. 2013.

QUEIROZ, N. M. G. P., ASSIS, J., OLIVEIRA, T. M. F. S., MACHADO, R. Z., NUNES, C. M., STARKE-BUZETTI, W. A., Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010

QUINNEL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, v.136, n.14, p.1915-1934. 2009.

RALEVIC, V., BURNSTOCK, G., Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. **Drug News Perspect.** 16, 133–140, 2003

REIS, A.B., MARTINS-FILHO, O.A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., CARVALHO, W.M., MAYRINK, W., FRANÇA-SILVA, J.C., GIUNCHETTI, R.C., GENARO, O., CORRÊA-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, p.68-75. 2006.

REGUERA, R.M. ; MORÁNA, M.; PÉREZ-PERTEJOA, Y., ESTRADA ,C.G.; FOUCE, R.B. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology.** v.227, p.98–114. 2016.

RIBEIRO, V.M. Tratamento da LV Canina e seu Impacto na Incidência de LV Humana e na Prevalência da LV em Cães - **Consulta de Expertos OPS/OMS sobre LVC**, Belo Horizonte, 2008.

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

SAMANTA, S.; GHOSHAL, A.; BHATTACHARYA, K.; SAHA, B.; WALDEN, P.; MANDAL, C. Sialoglycosylation of RBC in visceral leishmaniasis leads to enhanced oxidative stress, calpain-induced fragmentation of spectrin and hemolysis. *PLoS One*, v.7, n.7, e42361, 2012.

SEDER, R.A., PAUL, W.E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. **Annual Review of Immunology.** v.12, p.635-73. 1994.

SIES, H.; STAHL, W.; Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.1315-1321, 1995.

SILVA, A.V.M., et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.1, p. 324-328, 2005

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

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and Immunohistochemical Study of

Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum*-infected Dogs. **Journal of Comparative Pathology** v.130 p.7–12, 2004.

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

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

TITUS, R. G., RIBEIRO, J. M., The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease, **Parasitology Today**, vol. 6, p. 157-160, 1990.

TITUS, R. G., THEODOS, C. M., SHANKAR, A. H., HALL, L. R., Interactions between *Leishmania major* and macrophages, **Immunology Series**,v.60, p. 437-459, 1994.

THEODOS, C.M.; RIBEIRO, J.M.; TITUS, R.G.; Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. **Infection and Immunity**. v.59: p.1592-1598 1991.

TONIN, A. A.; CALADO, A.M.C.;BOTTARI, N.B.; DALENOGAREC, I.; THOMÉC, R.G.; DUARTED, T.; DUARTE, M.M.M.F.; MORSCHC, V.M.; SCHETINGERC, M.R.C.; ALVES, L.C.; TINUCCI-COSTAB, M.; DA SILVA. A.S.; Novel markers of inflammatory response and hepatic dysfunction in canine leishmaniasis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. v.44 p.61–64, 2016.

TRIGO, J., ABBEHUSEN, M., NETTO, E.M., NAKATANI, M., PEDRAL-SAMPAIO, G., DE JESUS, R.S., GOTO, Y., GUDERIAN, J., HOWARD, R.F., REED, S.G., Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f + MPL-SE. **Vaccine**. 28, 3333–3340, 2010

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIC, M.T.D.; MILAN, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.32, n.3, p.3-41, 2006.

VAN ZANDBERGEN, G., HERMANN, N., LAUFS, H., SOLBACH, W., LASKAY, T., *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes, **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4177-4184, 2002

VITORIANO-SOUZA, J., MOREIRA N MENEZES-SOUZA, D., ROATT, B.M., DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R.D., SIQUEIRA-MATHIAS, F.A., DE OLIVEIRA CARDOSO, J.M., GIUNCHETTI, R.C., DE SÁ, R.G., CORRÊA-OLIVEIRA, R., CARNEIRO, C.M., REIS, A.B., Dogs immunized with LBSap vaccine displayed high levels of IL-12 and IL-10 cytokines and CCL4: CCL5 and CXCL8 chemokines in the dermis. **Molecular Immunology**. v.56, p.540–548, 2013.

WELKER, A.F. MOREIRA, D.C., CAMPOS, E.G., HERMES-LIMA, M.; Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.165, p.384–404, 2013.

World Health Organization (WHO), 2016. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> acessado em setembro de 2016.

WOERLY, V., MAYNARD, L., SANQUER, A., EUN, H.M., Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniasis. **Parasitology Research**. v.105, p.463–469. 2009.

ZAMZAMI, N.; SUSIN, S.A.; MARCHETTI, P.; HIRSCH, T.; GOMEZ- MONTERREY, I.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v.183, n.4, p.1533-1544, 1996.

CAPÍTULO I

ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) infantum* *chagasi* (CUNHA E CHAGAS, 1937), SUBMETIDOS A TRATAMENTO EXPERIMENTAL

Marília de Andrade SANTANA¹; Nathieli Bianchin BOTTARI²; Aleksandro Schafer DA SILVA³, Maria Rosa Chitolina SCHETINGER², Vera M.aria MORSCH², Leucio Camara ALVES⁴.

1. Programa de Pós-graduação em Biociência Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco;
2. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica - Universidade Federal de Santa Maria;
3. Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.
4. Professor titular da disciplina de doenças parasitárias dos animais domésticos – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença infecciosa, multissistêmica, com patogenia imunomediada, mas que envolve também outros mecanismos, vias apoptóticas e citotóxicas intermediadas e estresse oxidativo. O tratamento dessa doença é baseado em fármacos leishmanicidas e leishmanioestáticos, que em muitos casos tem sucesso limitado. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar se o tratamento quimioterápico de cães com LVC minimiza o estresse oxidativo em cães. Nesse estudo foram incluídos 11 cães sintomáticos (dermatopatia, linfadenomegalia, anemia, trombocitopenia, onicogribose, oftalmopatia, emagrecimento e febre), separados em dois grupos após o tratamento (10mg/kg/VO/BID de Alopurinol) com base no número de sinais clínicos: Grupo A: (GA) animais que mantiveram três ou mais sinais clínicos após o tratamento (n=6); e Grupo B (GB), formado por cães assintomáticos, com um ou com dois sinais clínicos pós-tratamento (n=5). Amostras de sangue foram coletadas no dia do diagnóstico da doença e três meses após tratamento. Após o tratamento, houve diferenças entre os níveis séricos de EROs e TBARS entre os grupos GA e GB ($P<0.05$), isto é, os níveis de EROs e TBARS se mantiveram elevados nos animais do GA mesmo após o tratamento. Já, para os cães do GB, os níveis desses marcadores de reações oxidativas reduziram após tratamento, quando não apresentavam sinais clínicos. A atividade GST não diferiu entre grupos, antes e após tratamento. Resumidamente, o tratamento da LVC tendo como base o alopurinol teve eficácia para aproximadamente 50% dos cães, sendo que nos animais que responderam ao tratamento houve uma redução nos níveis de radicais livres e peroxidação lipídica, o que indica um equilíbrio oxidante/antioxidante, minimizando ou eliminando o estresse oxidativo, um distúrbio já descrito na leishmaniose.

INTRODUÇÃO

Cães infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* pode desenvolver uma síndrome imunomediada (BANETH et al., 2008; MAIA E CAMPINO, 2012; LEAL et al., 2014; PAPADOGIANNAKIS E KOUTINAS, 2015), devido a interação entre parasito e sistema imune. Em consequência disso, ocorre o aparecimento dos sinais clínicos (MAIA; CAMPINO, 2012), mas em alguns casos os animais são assintomáticos (KUMAR 2013; SYKES, 2014). Quando há sinais clínicos em cães, estes são variáveis (NOLI, 1999), no entanto, os mais comuns são as dermatopatias, representando o primeiro elo de interação parasita e o hospedeiro (SILVA, 2007), seguido de linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, caquexia, oftalmopatias e nefropatias (TAFURI et al., 2001).

De acordo com a literatura (Tonin et al. 2016), independente da presença dos sinais clínicos, o desequilíbrio nos mecanismos de redução e oxidação gerados durante a fagocitose pelos os macrófagos e neutrófilos ativados ocorre (BARROS et al., 2012). Dessa forma, convertem o oxigênio molecular em derivados (ou espécies) reativos (as) ao oxigênio (EROs), os quais são altamente reativos nas reações de oxidação em infecções por *Leishmania* sp (BABIOR, 2000; DRÖGE, 2002; BASSO, 2014), assim como outras células (ABBAS et al., 2008). De forma geral, a exacerbação de produção de EROs associada à exaustão do sistema antioxidante pode levar ao estresse oxidativo, consequentemente nesse distúrbio ocorre a peroxidação lipídica, que causa alteração no transporte iônico, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997), eventos bioquímicos negativos para o hospedeiro. No entanto, na maioria das vezes, o sistema antioxidante enzimático e não enzimático (BILDIK et al., 2004; BRITTI et al., 2008) eleva-se, objetivando neutralizar os radicais livres produzidos.

A ocorrência de estresse oxidativo em cães com leishmaniose já foi descrito (Tonin et al. 2016), no entanto, não é conhecido o status oxidantes e antioxidante após tratamento

com aluporinol. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do tratamento, assim como avaliar a ocorrência de estresse oxidativo em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e submetidos a tratamento experimental.

MATERIAL E METODOS

Animais utilizados no ensaio clínico

Foram utilizados onze cães domiciliados, provenientes da Região Metropolitana do Recife atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e submetido ao mesmo protocolo terapêutico descrito a seguir. Os animais permaneceram em suas residências durante todo o período do tratamento e as avaliações periódicas foram conduzidas no ambulatório. Coleiras repelentes aos flebotomíneos impregnadas com deltametrina a 4% foram utilizadas nos animais, para evitar a contaminação de vetores.

Exame Clínico e hematológico

O exame físico seguiu as normas semiológicas e foram observadas as alterações orgânicas sugestivas de LVC (BANETH E SOLANO-GALLEGO, 2013; GHARBI et al., 2015).

Diagnóstico Parasitológico

Após contenção física do animal, foi realizado o aspirado de linfonodo, citologia esfoliativa da pele e biópsia de medula óssea, diretamente no manúbrio do osso esterno. Foram confeccionados estiraços em lâminas de vidro coradas em corante tipo panótico rápido. A observação das formas amastigotas compatíveis com *Leishmania* sp foi realizada através de microscopia ótica em aumento 100x. A confirmação da doença e a identificação da espécie envolvida foi feita por PCR (RAMOS et al, 2012).

Tratamento dos animais

De posse do diagnóstico, foi dado início ao tratamento para todos os animais, a base de alopurinol na dose 10 mg/kg a cada 12 horas por via oral *Ad aeternum* como descrito por Guinel et al (1998) e Saridomichelakis (2005). Bem como domperidona na dose 1 mg/kg a cada 24 horas por via oral durante 30 dias segundo Meireles (2008).

Coleta de amostras e exame clínico

Antes do tratamento, dia do diagnóstico, definido como momento zero (M0) foi feita coleta de sangue, assim como três meses após o início de tratamento, definido como momento três (M3) foi realizada uma segunda coleta de sangue. Foram avaliando os sinais clínicos e amostras de sangue no volume de 5 ml foram colhidas para a realização do hemograma e análises bioquímicas descritas a seguir.

Determinação dos níveis séricos das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi estimada pela mensuração de TBARS e expressa em quantidade de Malondialdeído (MDA). Neste método, o MDA, é o produto final da peroxidação dos ácidos graxos, os quais reagem com o TBARS para formar um complexo colorido. O TBARS foi analisado no soro de acordo com a técnica descrita por Jentsch et al. (1996). O soro (200 µl) foi incubado a 95°C durante 60 minutos em meio ácido contendo 8,1% de dodecilsulfato de sódio, 0,5 ml de tampão de ácido acético (500 mM, pH 3,4) e 0,6% de TBARS. Os níveis de TBARS foram medidos a 532 nm, e a absorvância foi comparada com a curva padrão usando malondialdeído de acordo com o método de Ohkawa et al. (1978). Os resultados foram expressos em nanomoles de malondialdeído / mL.

Níveis de espécies reativas ao oxigênio (EROs)

Os níveis de EROs foi determinado indiretamente, isto é, a partir da determinação dos níveis de 2'-7'-Diclorofluoresceína (DCFH) de acordo com a produção de peróxido pelos

componentes celulares. Este método experimental de análise baseia-se na desacetilização da sonda DCFH-DA e sua subsequente oxidação por espécies reativas ao DCFH, um composto altamente fluorescente (Halliwell e Gutteridge 2007). O soro (10 μ l) foi adicionado a um meio contendo tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e DCFH-DA (1 mM). Após a adição de DCFH-DA, o meio foi incubado no escuro durante 1 h até o início do procedimento de medição de fluorescência (excitação a 488 nm e emissão a 525 nm, e ambas as larguras de fenda utilizadas foram a 1,5 nm). Os resultados foram expressos por U DCF / mL.

Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi realizada através de espectrofotometro a 340 nm pelo método de Habig et al. (1974). A mistura continha soro como teste, tampão de fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4), GSH 100 mM e CDNB 100 mM, que foi usado como substrato. A atividade enzimática foi expressa como η mol / h / mg de proteína.

Análises estatísticas

Os dados foram avaliados em primeiro lugar por estatística descritiva. Foram testados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk, e ascilação, kurtosis e homogeneidade pelo teste de Levene. O GST foi transformado em $\text{Log}_{10}(x + 1)$ antes de uma análise mais aprofundada. Um teste t de medida repetida foi usado para examinar as diferenças dos parâmetros entre o grupo A e o grupo B. Todos os parâmetros (ROS, TBARS e GST) que mostraram diferença ao longo do tempo (antes e depois), a diferença entre os grupos foi testada via t- Teste em cada tempo de observação (antes e depois). Foi considerado

significativamente diferente quando $p < 0,05$. O processo estatístico foi realizado utilizando R-language, v.3.1 (R Development Core Team 2012).

Resultado

Entre os sinais clínicos observados nos animais avaliados no momento zero (M0) foram evidenciados dermatopias, (11/11 - 100%), linfadenomegalia (11/11 - 100%), anemia (11/11 - 100%), trombocitopenia (11/11 - 100%), onicogribose (9/11 - 81,8%), oftalmopatia (7/11 - 63,6%), emagrecimento (6/11 - 54,5%) e febre (5/11 - 45,4%). Foi observado também melhora no quadro hematológico (Quadro 1). Por outro lado no momento três (M3), foram evidenciados a persistência dos sinais clínicos já relatados no M0 ou diminuição desses sinais, levando a formação dois grupos distintos de animais. Isto é, o Grupo A: (GA) foi formado por animais que mantiveram três ou mais sinais clínicos após o tratamento (n=6); e Grupo B (GB), formado por cães com apresentaram dois ou menos sinais clínicos pós-tratamento (n=5).

Após o tratamento, houve diferenças entre os grupos para ROS e TBARS (Figura 1), ou seja, os valores dessas variáveis foram maiores no soro dos cães do Grupo A. Observou-se diferença de redução significativa ao longo do tempo dos níveis de ROS e TBARS ($F = 5,52$, $p = 0,3$ e $F = 6,02$, $p = 0,2$, respectivamente) para cães de GB. Também foi observado um aumento significativo dos níveis de ROS e TBARS para animais do grupo A. Para a atividade da GST não houve diferença significativa ao longo do tempo do estudo, assim como entre grupos.

Quadro 1: Hm= Hemácias($10^6/mm^3$); Hg= Hemoglobina(g%);Ht= Hematócrito(%); VCM=Volume Globular Médio(fL); CHCM= Concentração de hemoglobina corpuscular média(%); RDW= Red cell distribution width(%); Pct = Plaquetas.

	M0							M3						
	Hm	Hg	Ht	VCM	CHCM	RDW	Pct	Hm	Hg	Ht	VCM	CHCM	RDW	Pct
ANIMAL 1	3,96	7,1	22	49,8	35,7	14,6	78.000	6,87	15,4	43	62,59	35,81	13,3	230.000
ANIMAL 2	3,21	6,78	18	48,5	33,9	16,4	60.000	5,4	13	32	56,3	30,4	14,8	152.00
ANIMAL 3	4,12	7,5	24	50,1	36,9	14,7	82.000	7,1	15,6	45	63,12	36	14	248.000
ANIMAL 4	4,63	7,4	25	49,8	37,3	15	39.000	7,5	16	42	64	36,8	15,2	300.000
ANIMAL 5	3,88	6,98	24	50	38,1	14,8	42.000	7,4	14,9	38	62,3	36,2	14,2	149.000
ANIMAL 6	4,23	6,58	19	48,1	37,1	13,9	34.000	5,2	12,8	30	61,7	35,9	14,7	126.000
ANIMAL 7	3,91	6,88	20	48,7	34,2	14,1	30.000	6,78	13,8	31	63,34	36,02	14,8	144.000
ANIMAL 8	4,3	7,23	23	49,9	37,1	14,2	43.000	6,1	14,2	29	62	35,9	14,2	139.000
ANIMAL 9	4,5	6,9	26	50,3	37,8	15,1	45.000	7,5	13,9	41	63,58	36,4	15,2	222.000
ANIMAL 10	4,34	6,22	20	49,1	37,5	15	38.000	6,9	13,2	30	63,2	35,6	14,9	150.000
ANIMAL 11	4,89	12,5	38	60,3	35,8	14	220.000	3,97	7,2	31	49,1	35,6	15,3	165.000

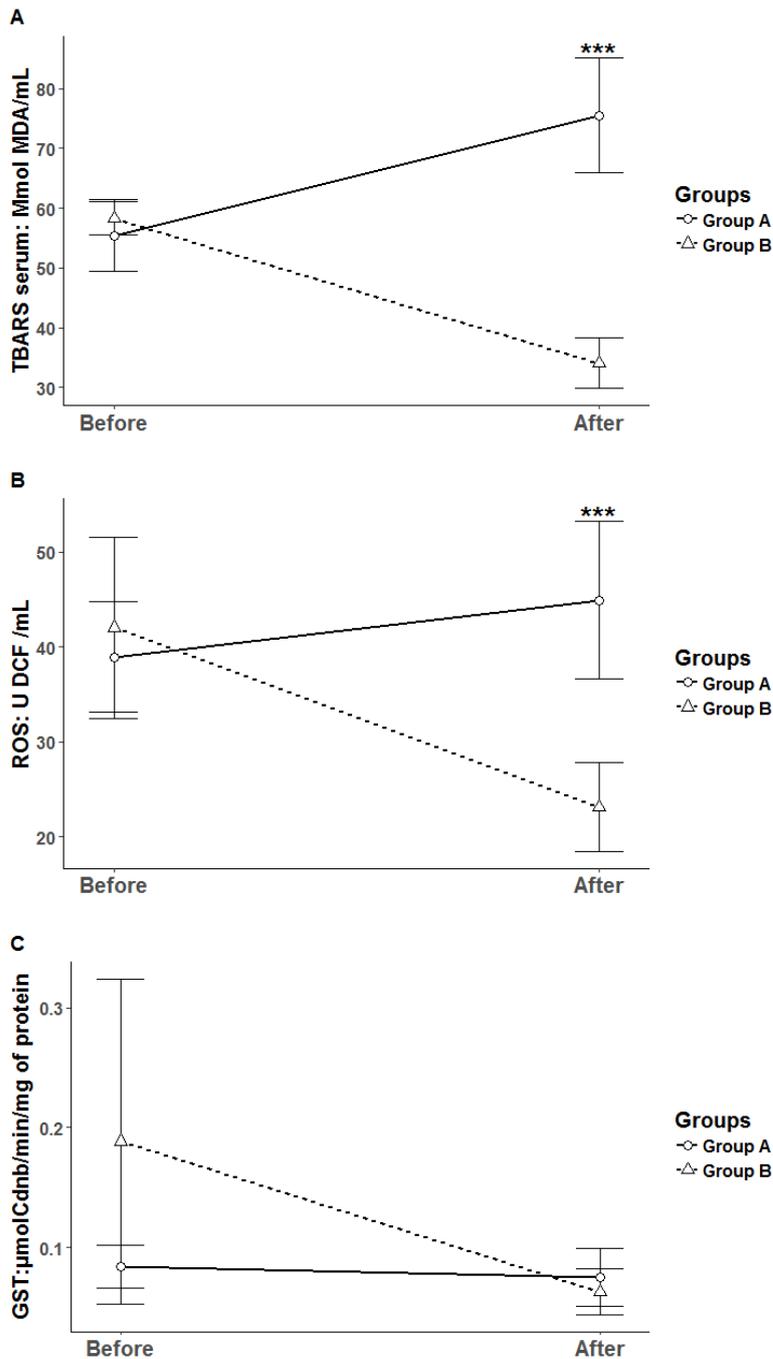


Figura 1: Níveis de TBARS (A), ROS (B) e atividade da GST (C) no soro de caes infectados por *Leishmania* spp, pré e pós-tratamento.

Discussão

As alterações clínicas observadas nos animais estudados, apesar de serem inespecíficas, são frequentemente observadas em cães com leishmaniose visceral. Dentre os

sinais clínicos, as dermatopatias tem sido assinalada como o sinal clínico mais comum nos animais infectados com *L. infantum* (SOLANO-GALLEGO et al. 2011), seguido de outros sinais clínicos como linfadenomegalia (BANETH et al. 2008), anemia (da COSTA-VAL et al.,2007) trombocitopenia (CORTESE et al. 2006) onicogribose (KOUTINAS et al. 2010), oftalmopatia (SAUQUILLO 2005) e emagrecimento (MANCIANTI et al.,1988), não sendo entretanto possível estabelecer um padrão patognomônico dos sinais clínicos na doença canina.

Por outro lado, a remissão temporária ou persistência em maior ou menor intensidade de sinais clínicos observados em animais do GA e GB no (M3) pode ter ocorrido em função do eficácia leishmanicida ou leishmaniostática dos fármacos utilizados no tratamento (BANETH e SHAW, 2002; CIARAMELLA; CORONA, 2003), sistema imune do hospedeiro (ALVAR et al., 2004) além do manejo da medicação por parte do tutor.

O tratamento da leishmaniose visceral canina continua sendo um desafio na medicina veterinária (DRUMOND; SILVA, 2011). Apesar da existência de fármacos como antimoniato de meglumina, alopurinol, anfotericina B, miltefosina (além da utilização de imunomoduladores (MIRÓ et al., 2005; ANDRADE et al., 2011), o tratamento da doença canina parece ainda estar associado a remissão dos sinais clínicos e redução na capacidade infectante dos animais (CIARLINI et al.,2010; TRIGO et al., 2010; REGUERA (2016).

No que concerne aos parâmetros avaliados no hemograma, particularmente a contagem de eritrócitos nos animais de ambos os grupos no M0, a anemia observada pode ser justificada por diferentes mecanismos como eritropoese diminuída, lise de hemácias e diminuição eritrocitária por produção de auto-anticorpos (FERRER, 2009).

Por outro lado, a redução de sinais clínicos observadas nos animais pode ser explicada com base na elevação ou diminuição dos níveis séricos de ROS's e TBARS em cães do GA e GB respectivamente.

A elevação do ROS's parece estar envolvido na patogênese de sinais clínicos, independente do estágio da doença (PALTRINIERI et al., 2010), justificando assim a persistência de três ou mais sinais clínicos após o tratamento nos animais do GA. Neste sentido acredita-se que a via apoptótica seja ativada pela elevação do ROS's que podem estar envolvidas particularmente na patogênese dos distúrbios dermatológicos (BICKERS & ATHAR 2006).

Nos cães do grupo B, no geral, observou-se melhora dos quadros clínicos e laboratoriais além da diminuição dos níveis de ROS's e TBAR's. Podemos atribuir essa diminuição ao protocolo de tratamento instaurado nesses animais.

O estresse oxidativo tem sido reconhecido como um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, o que favorece a funcionalidade dos agentes oxidantes no organismo. Sendo assim de forma indireta os derivados de aminoácidos, ácido nucléico e a peroxidação lipídica (KOHEN; NYSKA, 2002) são detectados como causa dos processos oxidativos, particularmente o TBAR's.

Bildik et al. (2004) constataram a ocorrência da peroxidação lipídica em cães infectados com *L. infantum*, o que sem dúvida repercute na melhora dos quadros clínicos, como aqui observado no GB.

Não foi observada diferença significativa no níveis de GST nos grupos estudados independentemente da presença de mais ou menos sinais clínicos.

Com relação à GST, sabe-se que esta enzima cataliza a conjugação com a glutathione com vários compostos que são produzidos *in vivo* na presença do estresse oxidativo (THOMPSON E FRANKLIN, 2010).

Vale salientar que a falta de um grupo controle e o tempo de tratamento e de acompanhamento dos cães pode ter interferido nos resultados aqui observados, já que foi relatado que os efeitos dos fármacos testados em tempos maiores de tratamento, repetições de ciclos e acompanhamentos dos animais por longos períodos, pode alterar estes resultados.

Conclusão

O tratamento da LVC tendo como base o alopurinol teve eficácia para aproximadamente 50% dos cães, sendo que nos animais que responderam ao tratamento houve uma redução nos níveis de radicais livres e peroxidação lipídica, o que indica um equilíbrio oxidante/antioxidante, minimizando ou eliminando o estresse oxidativo, um distúrbio já descrito na leishmaniose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p.1-88, 2004.

ANDRADE, H.M., TOLEDO, V.P., PINHEIRO, M.B., GUIMARAES, T.M., OLIVEIRA, N.C., CASTRO, J.A., SILVA, R.N., AMORIM, A.C., BRANDAO, R.M., YOKO, M., SILVA, A.S., DUMONT, K., RIBEIRO, M.L.. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (*L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.27;n.181(2-4), p.83-90. 2011

BANETH, G.; KOUTINAS, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v.24, p.324-330, 2008.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.315-324, 2002.

BICKERS, D.R., ATHAR, M.; Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **Journal of investigative Dermatology**. v.126,n.12, p.2565-2575. 2006.

BILDIK, A.; KARDIN, F.; SEYREK, K.; PASA, S.; OZENSOY, S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.77, n.1, p.63-66, 2004.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 25, p.358-368, 2003.

CIARLINI et al. Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Journal of Veterinary Medicine** v.53, p.546-548. 2006

GINEL, P.J., LUCENA, R., LOPEZ, R., MOLLEDA, J.M.: Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.39, p.271–274. 1998

KOHEN, R, NYSKA, A.; Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicology and Pathology**. v.30, n.6, p.620-50. 2002.

KOUTINAS, A.F., CARLOTTI, D.N., KOUTINAS, C., PAPADOGIANNAKIS, E.I., SPANAKOS, G.K., SARIDOMICHELAKIS, M.N.. Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. **Veterinary Dermatology**. V.21, p.572-577, 2010.

MANCIANTI, F., GRAMICCIA, M., GRADONI, L., PIERI, S., Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.82, p.566-567, 1988.

MEIRELES, J.A.F.S. – Terapêutica e profilaxia da Leishmaniose Canina – Leishmaniose canina – **Merial**, 2008).

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

PALTRINIERI, S.; RAVICINI, S.; ROSSI, G.; ROURA, X. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v.186, n.3, p.393-395, 2010.

RAMOS, R.A.N. ; RAMOS, C.A.M.; JUSI, M.M.G.; ARAUJO, F.R.; MACHADO, R.Z.M.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C.; Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum* chagasi in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.21, p.192–195. 2012.

REGUERA, R.M., MORÁNA, M., PÉREZ-PERTEJOA, Y., CARLOS GARCÍA-ESTRADA, RAFAEL BALA., N., Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.227 p.98–114, 2016.

SARIDOMICHELAKIS, M.N., MYLONAKIS, M.E., LEONTIDES, L.S., BILLINIS, C., KOUTINAS, A.F., GALATOS, A.D., GOULETSOU, P., DIAKOU, A., KONTOS, V.I., Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. **Veterinary Parasitology**. v.130, p.199–205. 2005

SAUQUILLO, M.C.T. La Leishmaniosis canina. 2a Parte. Manifestaciones oculares em la leishmaniosis canina. **Revista do Colegio Oficial de Veterinarios de Granada** p.39-43. 2005

SOLANO-GALLEGO L, MIRO G, KOUTINAS A, CARDOSO L, PENNISI MG, FERRER L, BOURDEAU P, OLIVA G, BANETH G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites and Vectors**. v.4 p.86. 2011.
THOMPSON, JA; FRANKLIN, CC .Enhanced glutathione biosynthetic capacity promotes resistance to As3+-induced apoptosis .**Toxicology Letters**, v.193, p.33-40, 2010.

TONIN, A.A. et al.: Novel markers of inflammatory response and hepatic dysfunction in canine leishmaniasis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v.44 p.61–64. 2016.

TRIGO, J.; ABBEHUSEN, M. NETTO, E. M.; NAKATANI, M.; PEDRAL-SAMPAIO, G.; JESUS, R. S.; GOTO, Y.; GUDERIAN, J.; HOWARD, R. F.; REED, S. G. Treatment of visceral leishmaniasis by the vaccine leish-111F+MPL-SE. **Vaccine**. 2010.