

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) infantum* SUBMETIDOS A  
TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS**

**ANDRÉIA KARLA MELO DO NASCIMENTO**

**RECIFE- PE**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) infantum* SUBMETIDOS A  
TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS**

**ANDRÉIA KARLA MELO DO NASCIMENTO**

**RECIFE- PE**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) infantum* SUBMETIDOS A  
TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS**

**ANDRÉIA KARLA MELO DO NASCIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau  
de Mestre em Ciência Animal Tropical.

**Orientador:** Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

**Co-orientador:** Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento  
Ramos

**RECIFE – PE**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

N244a Nascimento, Andréia Karla Melo do  
Avaliação do perfil eletroforético de cães naturalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* submetidos a tratamentos experimentais / Andréia Karla Melo do Nascimento. - 2019.  
39 f.: il.

Orientador: Leucio Câmara Alves.  
Coorientador: Rafael Antonio do Nascimento Ramos.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2019.  
Inclui referências.

1. Imunologia veterinária 2. Eletroforese 3. Leishmaniose visceral 4. Cão – Doença I. Alves, Leucio Câmara, orient. II. Ramos, Rafael Antonio do Nascimento, coorient. III. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) infantum* SUBMETIDOS A  
TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS**

**ANDRÉIA KARLA MELO DO NASCIMENTO**

Aprovado em \_\_\_\_\_ de 2019

---

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE  
Orientador

---

Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos  
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

---

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia  
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Edna Michelly de Sá Santos  
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por permitir a realização de um trabalho tão especial quanto este. Foi um aprendizado enorme, tanto pessoal quanto profissional.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, apoio e por estar sempre incentivando a seguir meus sonhos. Amo muito vocês!!!

Aos meus familiares, pela dedicação, amor e por acreditar em mim.

Ao meu melhor amigo Carlos, sempre presente, sempre disponível para conversar e ajudar.

Ao meu amigo e orientador Prof. Dr. Leucio Câmara Alves, por todos os ensinamentos, apoio e por acreditar no meu potencial. O senhor foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos, pela orientação e contribuição.

Ao meu amigo Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia, por todo suporte prestado, pelos diversos conselhos e por estar presente, principalmente quando mais precisei.

À equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias – UFRPE, por todos os momentos e pelas trocas de conhecimento.

À equipe do Hospital Veterinário – UFRPE, por todo suporte durante essa trajetória.

Ao Chefas e a Marilene do laboratório CIAC, pela grande ajuda na realização desse trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença parasitária infecciosa de caráter crônico e zoonótico com ampla distribuição mundial. No Brasil é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum*, onde a transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo dos flebótomos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Os animais acometidos apresentam-se assintomáticos ou com alterações dermatológicas, oculares, renais, hepáticas, hematológicas e bioquímicas. O tratamento será estabelecido de acordo com os achados clínicos e laboratoriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil eletroforético de cães naturalmente infectados por leishmania submetidos a três protocolos de tratamento. Foram utilizados 18 cães com diagnóstico parasitológico positivo para LVC divididos em três grupos. Animais do grupo 1 foram tratados com alopurinol e domperidona, no grupo 2 os fármacos foram miltefosina e alopurinol receberam e no grupo 3, marbofloxacina e alopurinol. Os animais foram avaliados antes do tratamento (momento zero – M0), 30, 60 e 90 dias após tratamento (M30, M60, M90) através do perfil eletroforético de proteínas séricas. Os principais achados foram hipoproteinemia, hiperproteinemia, hipergamaglobulinemia e redução da relação albumina/globulina. Essas alterações foram variando conforme o grupo e o tempo de tratamento, chegando a atingir a normalidade. Conclui-se que o uso dos fármacos marbofloxacina associado à alopurinol favoreceu a normalização dos parâmetros séricos.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Visceral Canina, eletroforese de proteínas séricas, imunologia.

## ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is an infectious parasitic disease of chronic and zoonotic nature with worldwide distribution. In Brazil, it is caused by the protozoan *Leishmania (Leishmania) infantum*, in which the transmission occurs during the hematophagy on phlebotomi of the *Lutzomyia longipalpis* species. Affected animals present as asymptomatic or showing skin, eye, kidney, hepatic, haematological and biochemical changes. The treatment will be established according to clinic and laboratory findings. The objective of this paper was to evaluate the electrophoretic profile of dogs naturally infected by leishmania, subjected to three treatment protocols. A number of 18 dogs with positive parasitic diagnosis for CVL were used, divided in three groups. The animals of group 1 were treated with allopurinol and domperidone. In group 2, the drugs used were miltefosine and allopurinol and in group 3, marbofloxacin and allopurinol were used. The animals were evaluated before treatment (at moment zero – M0), 30, 60 and 90 days after treatment (M30, M60, M90) by electrophoretic profiles of serum proteins. The main findings were hypoproteinemia, hyperproteinemia, hypergammaglobulinemia and reduction of the albumin/globulin ratio. Those changes varied according to the group and duration of treatment, and the rates eventually attained normality. It is concluded that the use of the drugs marbofloxacin associated with allopurinol favoured the normalization of serum parameters.

**Keywords:** Canine visceral leishmaniasis, electrophoretic of serum proteins, immunology.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 Leishmaniose visceral .....	14
2.2 Leishmaniose visceral canina .....	14
2.3 Etiologia e biologia parasitária .....	15
2.4 Imunopatogenia .....	15
2.5 Sinais clínicos .....	16
2.6 Alterações laboratoriais .....	17
2.7 Diagnóstico .....	17
2.7.1 Exame parasitológico .....	17
2.7.2 Cultura .....	17
2.7.3 Exames Sorológicos .....	18
2.7.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	18
2.8 Eletroforese das proteínas séricas .....	19
2.9 Tratamento .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
3.1 Objetivo geral .....	21
3.2 Objetivo específico .....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 Animais e aspectos éticos .....	22
4.2 Grupos experimentais .....	22
4.3 Análise laboratorial.....	22
4.4 Análise de dados .....	23
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	23
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	28
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio padrão das proteínas séricas dos cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> antes do tratamento (dia 0), 30, 60 e 90 dias após o tratamento .....	25
--	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

DPP -Teste imunocromatográfico rápido Dual Path Platform

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

## 1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de distribuição mundial (COSTA et al., 2016), comum em regiões tropicais, subtropicais e mediterrâneas (PIRAJÁ et al., 2013; KASZAK et al., 2015).

É transmitida aos hospedeiros susceptíveis por vetores flebotomíneos (ALVARENGA et al., 2010), do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* no velho e novo mundo respectivamente (GHARBI et al., 2015) constituindo um grave problema de saúde pública (REICHMANN, 2006; COSTA DE ALBUQUERQUE et al., 2017).

Várias espécies de mamíferos participam da cadeia epidemiológica de transmissão, incluindo o homem e o cão, sendo este considerado o principal reservatório urbano no Brasil, desempenhando assim um importante papel na manutenção da doença (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008; LARA-SILVA et al., 2015; MOHEBALI et al., 2016; SHOKRI et al., 2017).

Tendo como agente causal no Brasil a *Leishmania (Leishmania) infantum*, a infecção canina precede a humana, podendo, entretanto após o estabelecimento de um foco co-habitar com o ciclo canino (CAMPINO, 2003; SCHIMMING; PINTO E SILVA, 2012; SILVA et al., 2012).

A doença canina, também conhecida como Leishmaniose Visceral Canina (LVC), tem sido considerada como doença imunomediada (CABRAL et al., 1998; MORENO et al., 1999; PEREIRA JÚNIOR, 2014), e a progressão da infecção nos cães apresenta acentuada resposta humoral com altos títulos de imunoglobulinas e depressão da resposta imunológica celular (SOLANO-GALLEGO et al., 2016), determinando o surgimento de animais assintomáticos ou sintomáticos (SANTOS-GOMES et al., 2002; SRIVASTAVA et al., 2016).

Nos animais que apresentam quadro clínico, sinais de emagrecimento progressivo, alopecia, lesões cutâneas, diarreia, onicogrifose, esplenomegalia, linfadenomegalia, ceratoconjuntivite, além de desordens hematológicas e bioquímicas têm sido observadas (DAHER et al., 2017; SILVA et al., 2017).

Um achado importante do ponto de vista de patologia clínica é o aumento das proteínas séricas, notadamente as gamaglobulinas, originando um quadro de hiperglobulinemia, decorrente, da forte resposta imune humoral e intensa resposta inflamatória frente ao parasito, observadas no curso da enfermidade (AMUSATEGUI et al., 2003; BONFANTI; ZATELLI, 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

Desta forma o monitoramento do perfil eletroforético das proteínas séricas constitui um ponto importante durante o tratamento na LVC (NOLI, 1999; AMUSATEGUI et al., 2003).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil eletroforético de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* submetidos a três protocolos de tratamento.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL**

A leishmaniose visceral (LV) se apresenta entre as principais doenças negligenciadas, estando associada vulnerabilidade ambiental e social, constituindo um grave problema de saúde pública devido a sua distribuição geográfica

Tendo como agente etiológico no Brasil a *Leishmania (Leishmania) infantum* acomete diferentes espécies de mamíferos silvestres e domésticos e o homem, cuja transmissão ocorre através da picada de insetos vetores da espécie *Lutzomyia longipalpis* (MISSAWA et al., 2011; PAYANO, 2018).

No Brasil inicialmente, a LV foi caracterizada como doença rural e nos últimos anos ocorreu uma alteração no perfil de transmissão e a doença se tornou urbanizada em várias cidades brasileiras (BEVILACQUA et al., 2001; DESJEUX, 2004; MONTEIRO et al., 2005; CAMARGO et al., 2007). Neste contexto os cães domésticos são considerados os principais reservatórios (GONTIJO; MELO, 2004; PIMENTEL et al., 2015).

### **2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

A infecção por *L. (leishmania) infantum* é uma doença imunomediada de caráter sistêmica, com evolução crônica, podendo evoluir para óbito, caracterizada por alterações clínico-patológicas em vários órgãos incluindo a pele decorrente da forte resposta imune humoral e intensa resposta inflamatória frente ao parasito (FONTES; SILVA, 2011; HOSEIN et al., 2016) com período de incubação, que pode variar de alguns meses até vários anos (BANETH, 2006).

Sendo assim, progressão da infecção nos cães apresenta acentuada resposta humoral com altos títulos de imunoglobulinas e depressão da resposta imunológica celular (SOLANO-GALLEGÓ et al., 2016), determinando o surgimento de animais assintomáticos ou sintomáticos (SANTOS-GOMES et al., 2002; SRIVASTAVA et al., 2016). 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).

### **2.3 ETIOLOGIA E BIOLOGIA PARASITÁRIA**

No Brasil, o agente etiológico da LVC é um protozoário bifásico do gênero *Leishmania*, da classe Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, espécie *L. (Leishmania) infantum* (DANTAS-TORRES, 2006; LUKEŠ et al., 2007; BANETH et al., 2008).

Nos flebotomíneos, a hematofagia é um hábito exclusivo das fêmeas, que necessitam de sangue para a maturação dos ovos, desta forma, enquanto se alimenta, a fêmea pode ingerir macrófagos infectados. Ao realizar o repasto sanguíneo em outro vertebrado, os flebotomos inoculam saliva juntamente com as promastigotas (MONTEIRO et al., 2005).

Após a inoculação por insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis* nos cães susceptíveis, 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).

### **2.4 IMUNOPATOGENIA**

A resposta imune desempenha um papel fundamental nas manifestações clínicas da leishmaniose canina. Alguns cães apresentam uma forma subclínica de doença enquanto outros apresentam uma grave manifestação clínica (KASZAK et al., 2015).

A leishmaniose visceral canina pode ser considerada uma doença imunomediada devido à capacidade do parasito em modificar o sistema imunológico do hospedeiro (NOLI, 1999). O protozoário infecta principalmente as células do sistema fagocítico mononuclear,

porém outras células como neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos podem ser acometidas (KONTROS; KOUTRINAS, 1993; PEREIRA JÚNIOR, 2014).

Uma resposta efetiva contra a *L. (Leishmania) infantum* envolve uma resposta Th-1 que se baseia na produção de citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que ativa os macrófagos para a lise do parasito (QUINNELL et al., 2001) Porém a maioria dos cães desenvolve uma resposta Th-2, que é inefetiva contra o parasito, e responsável pela produção de IL-4 e IL-10. São as citocinas imunossupressoras que vão inibir a destruição do parasito pelo macrófago e consequentemente a disseminação de formas amastigotas (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; SONODA, 2007).

No caso de cães que desenvolvem a doença, ocorre uma depleção das células T dos seus órgãos linfóides, enquanto as células B desses órgãos prolifera (SALZO, 2008). A excessiva proliferação de células B e macrófagos resulta em hepatoesplenomegalia, linfadenopatia generalizada e hipergamaglobulinemia (STRAUSS-AYALI et al., 2000).

O aumento de produção de gamaglobulinas não conduz à proteção, ao contrário, é potencialmente prejudicial. Um importante dano causado pela hipergamaglobulinemia é a produção de grande quantidade de imunocomplexos circulantes, que, uma vez depositados nas paredes dos vasos sanguíneos, resultam em vasculites, poliartrites, uveítes, nefrites e glomerulonefrites (GARCIA-ALONSO et al., 1996; NOLI, 1999).

## 2.5 SINAIS CLÍNICOS

O aparecimento de sinais clínicos é consequência da relação entre parasito e resposta imune do hospedeiro (PEREIRA JÚNIOR, 2014).

Os sinais clínicos da LVC incluem fadiga, apatia, linfadenopatia generalizada, diarreia, epistaxe, edema de patas, paresia das patas posteriores, caquexia e atrofia muscular (NOLI; AUXILIA, 2005; SANTANA, 2017).

As alterações dermatológicas são as alterações clínicas mais frequentes encontradas na LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; ORDEIX et al., 2005). Dentre os sinais cutâneos podemos citar hiperqueratose, alopecia em volta dos olhos, dermatite descamativa, pelagem seca e quebradiça, alopecia sem prurido, dermatite pustular, úlceras indolores e onicogribose (NOLI; AUXILIA, 2005; ORDEIX et al., 2005; SANTANA, 2017).

Alterações oftalmológicas também são descritas, dentre elas a conjuntivite difusa ou nodular, blefarite nodular ou ulcerativa, esclerite difusa ou nodular, ceratoconjuntivite,



glaucoma, panoftalmia e uveíte anterior ou posterior a qual pode ser granulomatosa ou difusa (PAYANO, 2018).

## **2.6 ALTERAÇÕES LABORATORIAIS**

Nos exames laboratoriais, são encontradas alterações hematológicas como anemia, trombocitopenia, leucocitose ou leucopenia. Nas alterações bioquímicas, observa-se alteração de uréia podendo estar acompanhada ou não de aumento da creatinina, elevação de alanina aminotransferase (ALT) (PEREIRA JÚNIOR, 2014; PAYANO, 2018), além da relação albumina/globulina que aparece invertida em decorrência do comprometimento renal e/ou hepático (NOLI, 1999).

## **2.7 DIAGNÓSTICO**

Para o diagnóstico da LVC é necessário à realização de um exame clínico criterioso juntamente com a combinação dos métodos parasitológicos, onde se busca a visualização do protozoário; os métodos sorológicos, onde se detecta anticorpos anti-*Leishmania sp.* e os métodos moleculares, que detectam o DNA do parasito (FERRER, 1999; PEREIRA JÚNIOR, 2014).

### **2.7.1 Exame parasitológico**

É considerado o teste de excelência para confirmação da infecção. Baseia-se na observação do parasito na forma amastigota em esfregaços de medula óssea, linfonodos, citologia esfoliativa, entre outras amostras, corados por Giemsa, Leishman ou Panótico (GONTIJO; MELO, 2004, DANTAS-TORRES, 2006, BARBOSA et al, 2012).

A sensibilidade varia conforme o grau de parasitemia, tipo de amostra coletada e do tempo de processamento e leitura da lâmina, estando em torno de 80% para cães sintomáticos e menor porcentagem para cães assintomáticos. As principais vantagens são o baixo custo, rapidez e especificidade de 100% (FEITOSA, 2001; LAPPIN, 2004; BRASIL, 2006; DANTAS-TORRES, 2006, BARBOSA et al, 2012). Entretanto apresenta uma baixa sensibilidade com variância 60 a 70% (NOLI, 1999; ALVAR et al., 2004).

### 2.7.2 Cultura

O isolamento do parasito *in vitro* representa um método de confirmação do agente etiológico que permite posterior identificação da espécie envolvida (BRASIL, 2006). Utiliza diluição de amostras (aspirado de medula óssea, baço, fígado) em solução salina e posterior inoculação para o meio de cultura *Novy*, NNN (*Mc Neal e Nicolle*) e LIT (*Liver Infusion Triptofane*). Trata-se de um exame demorado que pode levar até quatro semanas para obter o resultado (BRASIL, 2006; RAMOS, 2012)

### 2.7.3 Exames Sorológicos

O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro* (BRASIL, 2006). Trata-se de um teste rápido, de fácil execução e sendo recomendado para triagem de cães sorologicamente negativos (GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2006; PEREIRA JÚNIOR, 2014).

O RIFI é considerado o confirmatório para o resultado do teste ELISA. É um teste de fácil realização e baixo custo, mas tem demonstrado sensibilidade que varia entre 68 e 100% e especificidade entre 74 e 100%. (GARCIA; MARCONDES, 2007). Apresenta como desvantagem, a ocorrência de reações cruzadas com outros protozoários (GONTIJO; MELO, 2004).

O teste imunocromatográfico *Dual Path Platform* (DPP - Bio-Manguinhos®), é um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza a proteína recombinante K39 (rK39) (BURNS-JR et al., 1993; BISUGO et al., 2007). Trata-se de método de triagem em decorrência da simplicidade e rapidez, apresentando uma alta sensibilidade (93 a 100%) e especificidade (99 a 100%) (ALVAR et al 2004).

A imuno-histoquímica é uma técnica que se baseia na detecção do parasito em secções coradas de tecidos (FARIA; ANDRADE, 2012). O método de revelação pela imunoperoxidase facilita a visualização de formas amastigotas nos tecidos, devido à utilização de anticorpos específicos marcados que se ligam aos antígenos presentes nos cortes histológicos (RIBEIRO et al., 2004; TAFURI et al., 2004).

#### **2.7.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

É baseado na amplificação de oligonucleotídeos que formam uma sequência conhecida do parasito. Este teste pode ser realizado em diferentes amostras, tais como aspirados de medula, aspirados de linfonodos, sangue e urina e biópsias de pele (FARIA; ANDRADE, 2012).

O método de PCR em tempo real, também pode ser utilizado para diagnóstico da LVC. consiste no monitoramento contínuo da amplificação do DNA do parasito, o que permite a quantificação parasitária em diferentes amostras.

Possuindo alta sensibilidade (80 a 93%) e especificidade de 100% para *Leishmania* sp., o diagnóstico molecular é obtido pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR) (NOLI, 1999; PEREIRA JÚNIOR, 2014).

#### **2.8 ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS**

As proteínas são macromoléculas compostas por aminoácidos, com ligações covalentes entre si, podem ser polares ou apolares, de acordo com o pH, devido à distribuição elétrica resultante das ligações covalentes ou iônicas de seus grupos estruturais (PAULA E SILVA et al., 2008).

A utilização de proteínas séricas como marcadores laboratoriais auxilia no diagnóstico e prognóstico de diversos processos patológicos (CERÓN et al., 2005). A eletroforese permite uma avaliação aproximada das concentrações de diversas proteínas.

Nos animais domésticos, as principais frações consideradas são albumina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, beta-1-globulina, beta-2-globulina e gama-globulina (CARREIRA et al., 2017).

De acordo com Noli (1999), Cerón et al. (2007), Solano-Gallego et al. (2009), Martinez-Subiela et al. (2011) e Carreira et al. (2017), os valores da eletroforese representa um indicador útil de avaliação de eficácia terapêutica, podendo ser necessário a realização do exame até 6 meses após o tratamento.

O parâmetro mais utilizado para avaliação da resposta à terapia é a relação albumina/globulina (A/G) e o estudo das frações proteicas cuja normalização é indicativa de

uma boa resposta à terapêutica. Contudo, nem todos os pacientes apresentam modificações nas frações proteicas e em alguns casos é possível verificar a presença de alterações no exame onde o tratamento foi bem-sucedido (NOLI, 1999; MARTÍNEZ-SUBIELA; CÉRON, 2005).

A infecção canina com *L. (Leishmania) infantum* geralmente cursa com hiperproteinemia associada à hiperglobulinemia e a elevados níveis séricos das proteínas de fase aguda (MEYER; HARVEY, 2004; MARCELLO, 2009).

Entretanto, o aumento de globulinas encontra-se associado à hipoalbuminemia, como resposta à baixa ingestão proteica nos casos de animais em anorexia ou má-nutrição prolongadas e as perdas decorrentes das lesões renais e hepáticas (CARREIRA et al., 2017).

Martinez-Subidella et al. (2011) avaliando o perfil das concentrações séricas das proteínas observaram uma resposta de fase aguda bastante rápida, com aumento pronunciado nos níveis proteicos antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos, denotando o possível emprego destas avaliações como marcadores precoces e, também, para o monitoramento do tratamento da doença.

## **2.9 TRATAMENTO**

Antes de iniciar o tratamento, torna-se necessário uma avaliação clínica detalhada, utilizando exames complementares como hemograma, avaliação de função hepática e renal e perfil eletroforético de proteínas séricas (RIBEIRO, 2007; PEREIRA JÚNIOR, 2014).

Os fármacos de eleição são o antimoniato de N-metilglucamina, alopurinol, anfotericina B, pentamidina, aminosidina, miltefosina (SALZO, 2008).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes como o antimoniato de N-metilglucamina, se baseia no bloqueio do metabolismo do parasito por meio da inibição da enzima fosfofrutoquinase, enzima chave da gluconeogênese, o que leva o parasita à morte (RIBEIRO, 2007). A utilização associada ao alopurinol aumenta a eficácia do tratamento e a diminuição da taxa de recorrência (NOLI, 1999; PEREIRA JÚNIOR, 2014).

O Alopurinol é um análogo de purina com atividade leishmaniostática. Ocorre uma metabolização pelo parasito para produzir um análogo de inosina, sendo incorporado ao ácido ribonucleico da *Leishmania*, provocando alterações na tradução proteica e inibição da multiplicação do parasita (GREENE, 2006; REGUERA et al., 2016).

Da classe dos poliênicos, a anfotericina B é um antibiótico obtido a partir do *Streptomyces nodosus*. Possui atividade contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Leishmania* spp. e atua rompendo a membrana celular via ligação com o ergosterol causando desorganização estrutural e alteração na permeabilidade da mesma, provocando assim a morte do parasito (LEMKE et al., 2005; BANETH, 2006; NOLI, 1999).

A maioria dos cães tratados com pentamidina melhora clinicamente, embora as recidivas sejam frequentes meses após o fim do tratamento. Trata-se de um fármaco de pouca eleição em decorrência da toxicidade e desenvolvimento de efeitos secundários (BANETH; SHAW, 2002).

A aminosidina é um antibiótico aminoglicosídeo que promove o bloqueio da síntese proteica e alterando a permeabilidade da parede citoplasmática do parasita (LÓPEZ, 2007). Demonstra ototoxicidade e nefrotoxicidade nas doses consideradas clínica e parasitologicamente eficazes e por isso seu uso não tem sido recomendado (BANETH; SHAW, 2002, NOLI; AUXILIA, 2005; SANTANA, 2017).

Com ação leishmanicida, a miltefosina pertencente ao grupo das alcilfosfocolinas (VISHER; GROUSSON; MÉDAILLE, 2007). Promove o aumento da ativação dos linfócitos T e macrófagos, importantes na destruição do parasita s (BANETH & SHAW, 2002). Recentemente recebeu uma formulação específica para uso veterinário (Milteforan ®, Virbac).

A fluoroquinolona de segunda geração, Marbofloxacin, apresenta atividade bactericida (REGUERA et al., 2016), melhorando a resposta do sistema imune favorecendo a produção de NO, IL 6 e TNF  $\alpha$  (VOULDOUKIS et al., 2006). A dose de 2 mg/Kg/dia por 28 dias produz remissão das sinais clínicas, porém a grande maioria dos casos tem reincidência (ROUGIER et al., 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Avaliar o perfil eletroforético de proteínas séricas dos cães naturalmente infectados por *Leishmania (leishmania) infantum* submetidos a três protocolos de tratamento.

#### **3.2 Objetivo específico**

- Identificar em quatro momentos: M0 (antes de iniciar o tratamento), M1 (30 dias após o tratamento), M2 (60 dias após o tratamento) e M3 (90 dias após o tratamento), as principais alterações no perfil eletroforético de proteínas séricas dos pacientes em tratamento.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais e aspectos éticos**

Foram incluídos 18 cães domiciliados na Região Metropolitana do Recife, de ambos os sexos, com idades entre 1 ano e 4 meses a 13 anos, sem distinção de raça que foram atendidos no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Todos os animais apresentavam sintomatologia clínica sugestivas de leishmaniose visceral e eram positivos no exame parasitológico (biópsia de medula óssea, aspirado de linfonodo e citologia esfoliativa). Os animais foram avaliados clinicamente e os dados obtidos foram anotados em uma ficha de identificação individual. Para a execução da pesquisa, todos os procedimentos foram realizados mediante a aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco – licença nº 137/2016.

### **4.2 Grupos experimentais**

Os animais foram divididos em três grupos de tratamento: O grupo 1 (n=6) receberam alopurinol na dose 10mg/kg por via oral de 12 em 12 horas e domperidona na dose de 1mg/kg por via oral a cada 24 horas. O grupo 2 (n=7), os animais receberam miltefosina na dose de 2 mg/kg/dia por 28 dias e alopurinol na dose de 10mg/kg por via oral a cada 12 horas. O grupo 3 (n= 5) que receberam marbofloxacina por via oral, manipulados comercialmente na dose de 2 mg/Kg/dia por 28 dias e alopurinol na dose de 10mg/kg por via oral a cada 12 horas.

### **4.3 Análise laboratorial**

Foram coletadas amostras de sangue para a realização do perfil eletroforético de proteínas séricas dos grupos em quatro momentos: M0 (momento zero), M30 (30 dias após o início do tratamento), M60 (60 dias após o início do tratamento), M90 (90 dias após o início do tratamento).

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção cefálica, femoral ou jugular em tubos plásticos sem anticoagulante. Essas amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm para separação do soro. As amostras de soro foram submetidas à separação das

frações proteicas por capilaridade utilizando o equipamento Capillarys HR (SEBIA-SP), segundo as normas sugeridas pelo fabricante.

#### **4.4 Análise dos dados**

As técnicas de estatística descritiva utilizadas foram frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e das medidas: média, desvio padrão e mediana para as variáveis numéricas. As técnicas de estatística inferencial corresponderam aos testes estatísticos: para as variáveis na forma contínua foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis na comparação entre os grupos e o teste de Friedman na comparação entre os tempos de avaliação; para as variáveis categóricas foi utilizado o teste Exato de Fisher (desde que condição para utilização do teste Qui-quadrado não foi verificada) entre os grupos. No caso de diferença significativa pelos testes de Kruskal-Wallis e de Friedman foram realizados testes de comparações múltiplas dos testes correspondentes.

A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 23.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O resultado da eletroforese de proteínas séricas dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes do tratamento (dia 0), e 30, 60 e 90 dias após o tratamento são apresentados na Tabela 1.

Com relação ao perfil eletroforetico no M0 foi possível verificar hiperglobulinemia e hipoalbuminemia com inversão da relação Albumina/Globulina (A/G) em todos os grupos, estando de acordo com Greene, (2006) e Solano Gallego et al, (2009) que observaram hiperproteinemia associada a hipoalbuminemia, demonstrando que o estudo das diferentes frações proteicas através da realização da eletroforese de proteínas séricas, pode ser um método eficaz na monitorização e avaliação da resposta à terapêutica para pacientes positivos para leishmaniose (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).



Os valores de albumina encontrados foram semelhantes aos descritos por Da Silva et al., (2011) e Freitas et al. (2012), que em suas análises encontraram hipoalbuminemia em cães sintomáticos para leishmaniose visceral canina.

A hipergamaglobulinemia tem lugar em função da excessiva proliferação de células B em resposta a presença do parasito (STRAUSS-AYALI et al., 2000). Contudo o aumento de produção de gamaglobulinas não conduz à proteção, e sim a uma grande quantidade de imunocomplexos circulantes, que resulta em nefrites e glomerulonefrites (GARCIA-ALONSO et al., 1996; NOLI, 1999).

Sendo assim a hipoalbuminemia aqui observada pode ter origem nesta patologia renal consequente a perda seletiva da albumina (NOLI,1999) ou ainda nas lesões hepáticas observado em cães com infecção natural por *L. infantum* com diminuição na síntese de albumina respectivamente (CÉRON et al.,2005)

Por outro lado, a redução do valor de albumina pode estar relacionada à baixa ingestão protéica nos casos de animais em anorexia ou má-nutrição prolongada (GRAUER, 2005; MARCONDES et al., 2006; CARREIRA et al., 2017).

Tabela 1 – Média e desvio padrão das proteínas séricas dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes do tratamento (dia 0), 30, 60 e 90 dias após o tratamento.

Variável	Avaliação	Grupo			Valor de p
		Alopurinol + Domperidona Média ± DP (Mediana)	Miltefosina + Alopurinol Média ± DP (Mediana)	Marbofloxacina Média ± DP (Mediana)	
Albumina (g/dl)	0 dia	2,38 ± 0,94 (2,24)	2,57 ± 1,32 (1,82)	2,93 ± 0,42 (2,90)	p <sup>(1)</sup> = 0,382
	30 dias	2,51 ± 0,78 (2,54)	2,80 ± 1,08 (2,71)	3,06 ± 0,57 (2,94)	p <sup>(1)</sup> = 0,509
	60 dias	2,44 ± 0,63 (2,36)	2,74 ± 1,04 (3,00)	3,18 ± 0,55 (2,97)	p <sup>(1)</sup> = 0,297
	90 dias	2,86 ± 0,73 (2,92)	3,00 ± 0,66 (3,02)	2,75 ± 0,69 (2,78)	p <sup>(1)</sup> = 0,600
	<b>Valor de p</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,206</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,918</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,426</b>	
Alfa1 (g/dl)	0 dia	0,31 ± 0,18 (0,27)	0,34 ± 0,10 (0,34)	0,24 ± 0,04 (0,23)	p <sup>(1)</sup> = 0,174
	30 dias	0,23 ± 0,03 (0,24)	0,33 ± 0,07 (0,35)	0,24 ± 0,10 (0,24)	p <sup>(1)</sup> = 0,074
	60 dias	0,23 ± 0,05 (0,23) <sup>(A)</sup>	0,34 ± 0,08 (0,32) <sup>(B)</sup>	0,29 ± 0,09 (0,29) <sup>(C)</sup>	p <sup>(1)</sup> = 0,049*
	90 dias	0,27 ± 0,09 (0,27)	0,36 ± 0,33 (0,22)	0,32 ± 0,13 (0,35)	p <sup>(1)</sup> = 0,673
	<b>Valor de p</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,511</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,693</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,171</b>	
Alfa2 (g/dl)	0 dia	0,77 ± 0,12 (0,78)	0,70 ± 0,09 (0,68)	0,68 ± 0,25 (0,79)	p <sup>(1)</sup> = 0,451
	30 dias	0,88 ± 0,31 (0,80)	0,76 ± 0,20 (0,73)	1,18 ± 0,72 (0,89)	p <sup>(1)</sup> = 0,390
	60 dias	0,67 ± 0,28 (0,61)	0,83 ± 0,20 (0,88)	0,83 ± 0,22 (0,79)	p <sup>(1)</sup> = 0,325
	90 dias	0,73 ± 0,17 (0,64)	0,56 ± 0,31 (0,68)	0,84 ± 0,22 (0,76)	p <sup>(1)</sup> = 0,269
	<b>Valor de p</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,420</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,185</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,817</b>	
Beta1 (g/dl)	0 dia	0,49 ± 0,25 (0,53)	0,39 ± 0,18 (0,37)	0,62 ± 0,29 (0,45)	p <sup>(1)</sup> = 0,278
	30 dias	0,48 ± 0,25 (0,42)	0,40 ± 0,18 (0,35)	0,36 ± 0,13 (0,43)	p <sup>(1)</sup> = 0,885
	60 dias	0,43 ± 0,30 (0,35)	0,47 ± 0,26 (0,49)	0,43 ± 0,13 (0,40)	p <sup>(1)</sup> = 0,854
	90 dias	0,46 ± 0,26 (0,39)	0,52 ± 0,32 (0,49)	0,39 ± 0,09 (0,43)	p <sup>(1)</sup> = 0,877
	<b>Valor de p</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,621</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,722</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,231</b>	
Beta2 (g/dl)	0 dia	1,01 ± 0,41 (0,89)	1,10 ± 0,41 (1,27)	1,29 ± 0,50 (1,52)	p <sup>(1)</sup> = 0,439
	30 dias	0,98 ± 0,39 (0,96)	0,94 ± 0,40 (0,97)	0,89 ± 0,56 (0,67)	p <sup>(1)</sup> = 0,922
	60 dias	0,83 ± 0,58 (0,74)	1,13 ± 0,44 (1,04)	1,53 ± 1,11 (1,13)	p <sup>(1)</sup> = 0,334
	90 dias	0,78 ± 0,28 (0,72)	1,10 ± 0,50 (1,33)	1,08 ± 0,95 (0,71)	p <sup>(1)</sup> = 0,653
	<b>Valor de p</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,124</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,747</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,079</b>	
Gamaglobulina	0 dia	4,06 ± 3,07 (3,04)	3,52 ± 2,67 (2,51)	2,13 ± 0,61 (1,86)	p <sup>(1)</sup> = 0,477
	30 dias	2,79 ± 1,21 (2,39)	2,89 ± 1,95 (2,18)	1,45 ± 0,40 (1,61)	p <sup>(1)</sup> = 0,081
	60 dias	2,53 ± 1,30 (2,42)	3,58 ± 2,69 (3,06)	1,60 ± 0,35 (1,62)	p <sup>(1)</sup> = 0,235
	90 dias	2,54 ± 1,46 (2,00)	2,85 ± 2,06 (2,34)	1,63 ± 0,63 (1,23)	p <sup>(1)</sup> = 0,585
	<b>Valor de p</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,206</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,445</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,564</b>	
PPT (g/dl)	0 dia	9,02 ± 3,01 (7,95)	8,61 ± 2,44 (8,10)	8,02 ± 0,48 (7,90) <sup>(a)</sup>	p <sup>(1)</sup> = 0,975
	30 dias	7,88 ± 0,64 (7,80)	8,11 ± 1,21 (7,80)	7,58 ± 0,71 (7,60) <sup>(b)</sup>	p <sup>(1)</sup> = 0,453
	60 dias	7,28 ± 1,61 (6,60)	9,09 ± 2,79 (8,60)	7,90 ± 0,89 (7,80) <sup>(a)</sup>	p <sup>(1)</sup> = 0,383
	90 dias	7,60 ± 1,22 (7,15)	8,39 ± 1,84 (8,10)	6,92 ± 0,86 (6,80) <sup>(c)</sup>	p <sup>(1)</sup> = 0,193
	<b>Valor de p</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,150</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,387</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,001*</b>	
A/G (g/dl)	0 dia	0,46 ± 0,38 (0,29)	0,55 ± 0,40 (0,37)	0,65 ± 0,27 (0,56)	p <sup>(1)</sup> = 0,317
	30 dias	0,52 ± 0,31 (0,44)	0,66 ± 0,44 (0,52)	0,71 ± 0,26 (0,65)	p <sup>(1)</sup> = 0,509
	60 dias	0,58 ± 0,36 (0,43)	0,51 ± 0,29 (0,57)	0,69 ± 0,27 (0,60)	p <sup>(1)</sup> = 0,600
	90 dias	0,68 ± 0,36 (0,63)	0,67 ± 0,31 (0,71)	0,77 ± 0,34 (0,85)	p <sup>(1)</sup> = 0,902
	<b>Valor de p</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,059</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,799</b>	<b>p<sup>(2)</sup> = 0,295</b>	

(\*) Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1) Através do teste Kruskal Wallis com comparações múltiplas do referido teste

(2) Através do teste Friedman com comparações múltiplas do referido teste

Obs. Se as letras maiúsculas entre parênteses são todas distintas, comprova-se diferença significativa entre os grupos correspondentes pelas comparações pareadas do determinado teste.

Obs. Se as letras minúsculas entre parênteses são todas distintas, comprova-se diferença significativa entre as avaliações correspondentes pelas comparações pareadas do determinado teste.

A relação albumina e globulina se mantiveram abaixo da normalidade e chegando ao valor de referência no grupo 1 após 90 dias de tratamento. No G2 esse valor oscilou entre abaixo e normal durante o tratamento. No G3, esse parâmetro se manteve normal durante os 90 dias.

Os valores de gamaglobulina observados no M0 encontravam-se aumentados nos grupos 1 e 2 (Tabela 1).

O aumento da gamaglobulina está associado principalmente ao aumento da produção de imunoglobulinas (IgE, IgG, IgG1 E IgG2) decorrente da produção policlonal de anticorpos (NOLI, 1999; DA SILVA et al., 2011; FREITAS et al., 2012).

Não foram constatadas diferenças estatísticas significativas em relação aos valores de alfa 1, alfa 2 e beta 2, que se apresentaram dentro da normalidade durante todo o período estudado enquanto o perfil de beta 1 se manteve abaixo dos valores normais.

Esses resultados estão discordantes daqueles apresentados por Sasanelli et al (2007); Silva et al, (2011) que observaram aumento das frações alfa 1, alfa 2 associados a fase aguda da infecção. É provável que os cães aqui estudados encontrassem na fase crônica da infecção, motivo pelo qual as proteínas de fase aguda apresentavam-se dentro da normalidade.

No momento 30, a hipergamaglobulinemia continuava presente apenas no G1 e G2, enquanto o perfil da albumina atingiram os valores dentro normalidade no G2 e G3 e. relação A/G apresentavam valores abaixo da normalidade no G1 e G2.

Após 60 dias de tratamento, foi observado ainda elevação da gamaglobulina no G1 e G2 e diminuição dos níveis no G1 e um progressivo retorno a normalidade da relação A/G.

Ao término do monitoramento terapêutico, ou seja, 90 dias a hipergamaglobulinemia continuava presente no G1 e G2, e os níveis de albumina apresentaram valores dentro da normalidade em todos os grupos assim como a relação A/G.

Apesar das variações durante o tratamento verificou um progresso ao retorno da normalidade durante os três momentos de estudo, estando diretamente relacionado com a normalização das concentrações séricas da albumina e das restantes globulinas. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Martinez Subiela & Ceron, (2005), que observaram um aumento da relação A/G durante o tratamento.

## **6. CONCLUSÃO**

A realização do proteinograma durante o tratamento de cães com leishmaniose visceral mostrou ser simples e apresentou valor no monitoramento terapêutico em curtos períodos de tratamento. Apesar da similaridade das alterações do perfil eletroforético nos diversos tratamentos, os resultados aqui apresentados sugerem que a utilização da marbofloxacina associada ao alupurinol mostrou-se mais eficiente no retorno a normalidade das proteínas plasmáticas.

## REFERÊNCIAS

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

ALVARENGA, D. G. et al. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.43, n.2, p.4-7, 2010.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÓGUEZ 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. et al. Canine Leishmaniasis – New concepts and insights on expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v.24, n.7, p.324-330, 2008.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. **Canada: Saunders Elsevier**, 3. ed., cap. 73, p. 685-698, 2006.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.106. n.4, p.315-324, 2002.

BARBOSA, V. T.; SILVA, M. A. G.; SOUSA, M. G.; GERING, A. P.; SANTOS, H. D.; LAUS, J. L. Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1465-1470, 2012.

BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.1 p.1-8, 2001.

BISUGO, M. C. et al. Avaliação do diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina com a utilização do teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**; v.66. n.2, p.185-193, 2007.

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

BOTTERO, E.; POGGI, M.; VIGLIONE, M. Lesioni Papulari Indotte da Leishmania spp. In 8 Cani Giovani. **Veterinaria**. Ano 20, n.1. p.33-36, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BURNS-JR, J. M.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARO, R.; REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.90, p.775–779, 1993.

CABRAL, M.; GRADY, J. E. O.; GOMES, S.; SOUZA, J. C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, n.76, p.173-180, 1998.

CAMARGO, J. B. et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, v.71, p.86-92, 2007.

CAMPINO, L.M. In: FARREL, J. ed., World Class Parasites: *Leishmania*, v.4, **Kluwer Academic Publishers**. Boston, Dordrecht, London, 2003.

CARREIRA, M. L.; MONTEIRO P.; AZEVEDO, P. Total proteins,  $\beta$ - and  $\gamma$  globulins as efficacy therapy response indicators in dogs infected with Leishmania infantum – a Review. **Journal of Veterinary Healthcare**. v.1, p.1-11, 2017.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **American Society for Veterinary Clinical Pathology** v.34, p.85-99, 2005.

COSTA DE ALBUQUERQUE, M. A. C. et al. Mortality Trends for Neglected Tropical Diseases in the State of Sergipe, Brazil, 1980–2013. **Infectious Diseases of Poverty**, v.6; n.1; p.2-8, 2017.

COSTA, G. R. T. Atuação da Vigilância Ambiental em saúde no controle da Leishmaniose visceral em condomínio horizontal na Região Administrativa Jardim Botânico, Distrito Federal. **Com. Ciências Saúde**, v.21, n.2, p.167-172, 2016.

DAHER, E. F. et al. Hyponatremia and risk factors for death in human visceral leishmaniasis: new insights from a cross-sectional study in Brazil. **Infectious Diseases**, v.17, p.168, 2017.

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, p.352-356, 2006.

DA SILVA, A. D. F.; LIMA, M. C. J. S.; SOTO-BLANCO, B. Perfil hematológico e eletroforético de proteínas séricas em cães sopropositivos para leishmaniose visceral canina no Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p300-305, 2011.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v. 27, n.5, p. 305-318, 2004.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde** 3(2): p.47-57, 2012.

FEITOSA, M. M. **Leishmaniose visceral: um desafio crescente**. São Paulo: Intervet pet, 15p. 2001.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: KILLICK-KENDRICK. Canine leishmaniasis: an update. Barcelona, Proceedings... Barcelona, p. 6-10, 1999.

FONTES, S. D.; SILVA, A. S. A. Leishmaniose visceral canina. **Anais III SIMPAC.**– Viçosa-MG v.3, n.1, p. 285-290, 2011.

FRAGA, D. B. et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting Leishmania infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 591-594, 2012.

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.

GHARBI, M.; MHADHBI, M.; REJEB, A.; JAOUADI, K.; ROUATBI, M.; DARGHOUTH, M. A. Leishmaniosis (Leishmania infantum infection) in dogs. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 34, n. 2, p. 613–626, 2015.

GARCÍA-ALONSO, M. et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, New York, v. 18, p. 617-623, 1996.

GARCIA, F. A. I; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista Clínica Veterinária**. n.71, p. 34-42, 2007.

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

GRAUER, G. F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. **Journal of Small Animal Practice**. v.46, p. 469-478, 2005.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, p.685 698, 2006.

HOSEIN, S.; DAMER, P.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 1, p.1-21, 2016.

KANEKO, J. J. Serum proteins and dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. **Academic Press**, 5ª ed., p. 117-138, 1997.



KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press; 2008.

KASZAK, I.; PLANELLAS, M.; DWORECKA-KASZAK, B. “Canine leishmaniosis-an emerging disease,” **Annals of parasitology**, v. 61, n. 2, p. 69–76, 2015.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. Old World canine leishmaniasis. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.33, p.949-960, 1993.

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.

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

LAPPIN, M. R. Infecções protozoárias e mistas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária. Doenças do Cão e do Gato**. 5<sup>a</sup>ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p.430-440, 2004.

LARA-SILVA, F. O. et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**. v.148, p.128-136, 2015.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n.2, p. 151-162, 2005.

LOPEZ, X. R. Diagnosis of leishmaniosis. In *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference/42nd annual national congress of AVEPA*, Barcelona, Spain, 2007.

LUKEŠ, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.104, n.22, p.9375-9380, 2007.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and phenotypic cell Profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. **Journal of Tropical Medicine**. p.1-7, 2012.

MARCELLO, G. C. G. Hemograma, proteinograma e determinação das atividades séricas da haptoglobina e da ceruloplasmina em cães (*Canis familiaris*) sororretores para *Leishmania sp.* da região metropolitana do Rio de Janeiro – RJ. Dissertação. Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária; 2009.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S., CERÓN, J. J. Evaluation of acute phase protein indexes in dogs with leishmaniasis at diagnosis, during and after short-term treatment. **Journals of the Czech Academy of Agricultural Sciences** v.50, p.39–46, 2005.

MARTINEZ-SUBIELA, S.; STRAUSS-AYALI, D.; CERÓN, J. J.; BANETH, G. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.197-202, 2011.

MEYER, D.; HARVEY, J. Evaluation of Plasma Proteins. In: Meyer DJ and Harvey JW. eds. **Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis**. 3rd ed. St. Louis. MO:Saunders: p.156 -166, 2004.

MISSAWA, N. A. et al. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado do Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p.76-78, 2011.

MOHEBALI, M. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Wild Canines Fox, Jackal, and Wolf in Northeastern Iran Using Parasitological Serological, and Molecular Methods. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v.10, n.4, p.538–545, 2016.

MONTEIRO, E. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.2, p.147-152, 2005.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v.71, n.3/4, p.181-195, 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.

NICOLATO, R. D. C.; DE ABREU, R. T.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. D. O.; REIS, L. E. S.; CARVALHO, M. D. G.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; BOUILLET, L. E. M.; LEMOS, D. S.; COURA-VITAL, W.; BARBOSA REIS, A. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**, n.2, p.16-24, 1999.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T.; Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, n.16, p.213-232, 2005.

ORDEIX, L.; SOLANO-GALLEGU, L.; FONDEVILA, D. D.; FERRER, L. M.; FONDATI, A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n. 3, p. 187–191, 2005.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; VLEMMAS, J.; LEKKAS, S.; KARAMERIS, A.; FYTIANOU, A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, n. 3–4, p. 227–237, 2005.

PAULA E SILVA, R. O.; LOPES, A. F.; FARIA, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 18, p.116-122, 2008.

PAYANO, V. J. H. **Avaliação dos achados hematológicos e da bioquímica sérica em cães infectados por *Leishmania infantum* submetidos a tratamento experimental**. Dissertação (Mestrado Biociência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 2018.

PERREIRA JÚNIOR, J. R. **Avaliação clínica e laboratorial de cães (*canis familiaris*) *Linnaeus, 1758, natural* naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CUNHA E CHAGAS, 1937) SWAW, 2002 submetidos a diferentes protocolos**

**de tratamento.** Tese (Doutorado Biociência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 2014.

PIMENTEL, D. S.; RAMOS, R. A.; SANTANA, M. A.; MAIA, C. S.; CARVALHO, G. A.; SILVA, H. P.; ALVES, L. C. Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in na edemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, n.4, p491-493, 2015.

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

QUINNEL, R. J. et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 253-261, 2001.

RAMOS, A. R. N. **Avaliação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da PCR em tempo real (qPCR) no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina utilizando diferentes amostras biológicas.** Dissertação (Mestrado Biociência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 2012.

REGUERA, R. M.; MORÁN, M.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; GARCÍA-ESTRADA, C.; BALAÑA-FOUCE, R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 227, p. 98–114, 2016.

REICHMANN, M. L. A. B. Leishmaniose visceral canina – uma zoonose reemergente. **In: 1º Fórum sobre leishmaniose visceral canina**, Jaboticabal, SP, 2006.

RIBEIRO, V. M.; MARTINS, E. A. N.; RIBAS, J. A. S.  $\beta^2$ Y Globulin Fractions in dogs infected with *Leishmania infantum* and cutaneous infectiousness using na immunohistochemical method. **International congresso on Leishmaniasis**, Italy. Proceedings. 2004.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspecto de tratamento e controle. **Revista clínica veterinária**. n.71 p. 66-76, 2007.

ROUGIER, S.; HASSEINE, L.; DELAUNAY, P.; MICHEL, G.; MARTY, P. One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 245–253, 2012.

SALZO, P. S. Aspectos Dermatológicos da Leishmaniose Canina. **Nosso Clínico**, Ano11, n. 63, p. 30- 34, 2008.

SANTANA, M. A. **Estresse oxidativo em cães (*Canis familiaris*) Linnaeus 1758, naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CUNHA E CHAGAS, 1937) SWAW, 2002 submetidos a tratamento experimental**. Dissertação (Mestrado Biociência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE 2017.

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

SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.88, p.21-30, 2002.

SASANELLI, M.; PARADIES, P.; CAPRARII, D.; GRECO, B.; PALO, P.; PALMISANO, D.; CARELLI, G. Acute-Phase Proteins in Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum* During and After Long-term Therapy with Allopurinol. **Veterinary Research Communications**, v.31. P.335–338, 2007.

SCHIMMING, B. C.; PINTO E SILVA, J. R. C. Leishmaniose Visceral Canina – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano 10, n.19, 2012.

SHOKRI, A.; FAKHAR, M.; TESHNIZI S. H. Canine visceral leishmaniasis in Iran: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v.165, p.76-89, 2017.

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

SILVA, J. P. et al. Fatores associados à infecção por *Leishmania chagasi* em cães domiciliados de Teresina, Estado do Piauí, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.4, p.480-484, 2012.

SILVA, K. R. et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.112, n.1, p.53-62, 2017.

SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3th. Ed. Philadelphia, p. 769-777, 1990.

SOLANO-GALLEGO, L.; DI FILIPPO, L.; ORDEIX, L.; PLANELLAS, M.; ROURA, X.; ALTET, L.; MARTÍNEZ-ORELLANA, P.; MONTSERRAT, S. Early reduction of *Leishmania infantum*-specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease. **Parasites & Vectors**. v.9, n.1, 2016.

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**, n.165, p.1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.1-18, 2009.

SONODA, M. C. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 á 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. Dissertação (Mestrado

Clínica Médica Veterinária) Programa de Pós- Graduação em Clínica Médica Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2007.

SRIVASTAVA, S. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, n. 9, v. 277, 2016.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine visceral leishmaniasis. In: Recent Advances in Canine Infections Diseases. **International Veterinary Information Service**, 2000.

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

TRAVI, B. L.; OSÓRIO, Y.; GUARÍN, N.; CADENA, H. *Leishmania (Leishmania)chagasi*: Clinical and Parasitological Observations in Experimentally Infected *Didelphis marsupialis*, Reservoir of New World Visceral Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**. v.88, p.73-75, 1998.

VISCHER, C.; GROUSSON, D.; MÉDAILLE, C. 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, 2007.

VOULDOUKIS, I.; ROUGIER, S.; DUGAS, B.; PINO, P.; MAZIER, D.; WOEHLÉ, F. Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of

marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 137–146, 2006.

WHO – World Health Organizations. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 15 dez. 2018.