

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIA ÁGRARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

STELA RECHINELLI PASSOS

**TRATAMENTO CLÍNICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA CANINA COM FURAZOLIDONA E DOMPERIDONA**

ALEGRE-ES

2014

STELA RECHINELLI PASSOS

**TRATAMENTO CLÍNICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
CANINA COM FURAZOLIDONA E DOMPERIDONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico, epidemiologia, controle e terapia das enfermidades dos animais.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Santos Zanini

ALEGRE-ES
2014

STELA RECHINELLI PASSOS

**TRATAMENTO CLÍNICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
CANINA COM FURAZOLIDONA E DOMPERIDONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico, epidemiologia, controle e terapia das enfermidades dos animais.

Aprovada em 14 de março de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA



A Vitor Passos Avellar Machado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos animais, que foram o grande motivo da chegada até aqui.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (CAPES/MEC), pela concessão da bolsa de estudo durante o período cursado.

A meus pais, Marcus e Tânia, meu irmão Marcus (Tesouro), e tias, tios, primas e agregados pelo amor incondicional, apoio e carinho. Ao Leonard pela grande paciência e companheirismo, e nosso filho lindo, Vitor! Família é assim!

Ao meu querido amigo Júlio pelo carinho e companheirismo, ajuda com o projeto, entre tantas outras coisas!

Ao Zanini pelos ensinamentos, paciência e total disponibilidade para o trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e ensinamentos.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

Walter S. Landor

RESUMO

RECHINELLI PASSOS, STELA. **Tratamento clínico da Leishmaniose Tegumentar Americana canina com furazolidona e domperidona.** 2014. 37p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2014.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é um problema de saúde pública em países da América subtropical. A eutanásia de cães infectados não é obrigatória como na leishmaniose visceral, e o tratamento desses animais com fármacos utilizados para tratamento humano da leishmaniose é proibido. Objetivou-se com o presente estudo avaliar a eficácia do tratamento com furazolidona e domperidona em cães sintomáticos para LTA causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A confirmação da infecção foi realizada por cultura do parasita a partir de amostra de tecido coletada da borda da lesão e PCR de amostra da cultura. Após um período de adaptação de 60 dias, os animais foram divididos em grupo controle (n = 4) e grupo tratado (n = 8). O grupo tratado recebeu furazolidona durante 21 dias, intercalada com domperidona durante 10 dias. Os cães que não mostraram remissão da lesão durante este período receberam novamente o mesmo ciclo de tratamento até um total de 93 dias. Entre os oito animais tratados, sete (87,5%) apresentaram remissão da ferida após o tratamento. O animal que não obteve cura clínica apresentou redução de medidas da lesão 93 dias de tratamento. Todos os animais foram observados durante 12 meses após o início da administração dos fármacos. Não observou-se recidiva de lesões nos animais em que houve sua remissão ou autocura nos animais do grupo controle durante este período. Nossos dados sugerem que o tratamento com furazolidona e domperidona é eficaz para o tratamento das lesões de cães sintomáticos para LTA causada por *L. (V.) braziliensis*.

Palavras-chave: cães; *Leishmania*; tratamento.

ABSTRACT

RECHINELLI PASSOS, STELA. **Clinical treatment of canine Cutaneous Leishmaniasis with furazolidone and domperidone.** 2014. 37p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2014.

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a public health problem in countries of sub-tropical America. Euthanasia of dogs affected is not obligatory as in visceral leishmaniasis, though treatment with drugs for human treatment is prohibited and there is no treatment recommended. The aim of this study was to evaluate the efficacy of treatment with furazolidone and domperidone in dogs symptomatic for ACL caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Confirmation of infection was performed by PCR and parasite culture from tissue collected from lesion limit. After adaptation period of 60 days, the animals were divided into a control group (n = 4) and treated group (n = 8). The treated group received furazolidone treatment for 21 days interspersed with domperidone for 10 days. The dogs that showed no lesion remission during this period received again the same treatment cycle up to 93 days. Among the eight treated animals, one dog showed no one lesion remission after treatment. All animals were observed for 12 months after treatment. There was no recurrence of injury to the animals in it was forgiveness, neither self-healing in the control group during this period. The animal that had no wound healing showed reduction of injury measures after treatment. Our data suggest that furazolidone and domperidone administration is effective for wound healing of symptomatic dogs for ACL caused by *L. (V.) braziliensis*.

Keywords: dogs; *Leishmania*; treatment.

LISTA DE SIGLAS

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)

IFI – Imunofluorescência Indireta

LC – Leishmaniose Cutânea

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	11
2. Revisão de Literatura	13
2.1 Leishmaniose.....	13
2.2 Ciclo de vida do parasita.....	15
2.3 Leishmaniose Tegumentar Americana	16
2.4 O cão e a leishmaniose	17
2.5 Diagnóstico canino.....	18
2.6 Tratamento.....	19
2.7 Furazolidona	20
2.8 Domperidona	21
3. Referências.....	22
4. CAPÍTULO 1: Tratamento clínico da Leishmaniose Tegumentar Americana com furazolidona e domperidona	26
ANEXOS	39
ANEXO A – Tabela 1	40

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose que representa um problema de saúde pública na América Subtropical, inclusive no Brasil (CUPOLILLO et al., 2003; BRITO et al., 2009). Seus agentes causadores são protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, divididos nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (SILVEIRA et al., 2009).

Esta doença envolve o homem e animais domésticos como hospedeiros, animais silvestres como reservatórios e flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* seus principais vetores biológicos nos países do Novo Mundo (DANTAS-TORRES, 2007).

O papel do cão no ciclo da enfermidade ainda representa motivo de questionamento entre pesquisadores, principalmente quanto ao risco deste atuar como animal reservatório, servindo de fonte de infecção para os insetos vetores, e conseqüentemente para humanos (FALQUETO et al., 2003; DANTAS-TORRES, 2007).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2010), não são recomendadas ações de controle dos animais domésticos com LTA, já que estes não são entendidos como reservatórios das espécies causadoras da doença. Por outro lado, o tratamento dos animais acometidos não é permitido com drogas para tratamento da leishmaniose em humanos, a fim de evitar resistência parasitária a estes fármacos.

Assim, os animais acometidos pela doença permanecem com as lesões até que ocorra autocura ou agravamento das mesmas, comprometendo seu bem estar. Além disso, as lesões ficam expostas aos flebotomíneos em áreas peridomiciliares, possibilitando a infecção destes vetores, ainda que em valores insuficientes para manutenção do ciclo doméstico da doença (VEXENAT; BARRETTO; ROSA, 1986).

Drogas como a furazolidona e domperidona não são preconizadas para o tratamento da leishmaniose humana pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). Tais fármacos podem ser testados para tratamento da LTA nos animais

domésticos, considerando-se que diferentes espécies podem apresentar respostas distintas a um mesmo fármaco.

A furazolidona é um derivado nitrofurano com ação antibacteriana e antiprotozoária não preconizada para o tratamento da leishmaniose em humanos. Sua atividade contra protozoários do gênero *Leishmania* está relacionada a alterações morfológicas e perda de organelas, principalmente membrana nuclear e mitocôndria (REIMÃO; TANIWAKI; TEMPONE, 2010). Possui metabolização intestinal, biotransformação hepática e excreção renal (VROOMEN et al., 1990). Esta droga provocou redução na concentração de formas amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* no fígado e baço de hamsters infectados quando administrada para tratamento de LV (TEMPONE et al., 2010).

A domperidona é um antagonista de receptores D₂, utilizada em humanos e animais por seus efeitos gastrocinéticos e antieméticos. Como efeito secundário, esta droga ativa a resposta imune celular por promover um aumento da concentração de prolactina sérica. Além de sua principal função como estimulante da produção de leite em mamíferos, a prolactina é classificada como uma citocina pró-inflamatória derivada de linfócitos, possuindo assim papel central na resposta imune (HINTERBERGER-FISCHER, 2000). Em estudo realizado por Gómez-Ochoa et al. (2009), a domperidona apresentou eficácia na redução de sinais clínicos e título de anticorpos em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum*.

Objetivou-se com este trabalho verificar a eficácia do tratamento clínico com furazolidona e domperidona de cães sintomáticos para LTA provocada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma zoonose de ocorrência mundial. Apesar de representar um grave problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento, está entre as doenças infecciosas mais negligenciadas (BAÑULS et al., 2011).

Anualmente, a incidência global se aproxima de dois milhões de novos casos (1,5 milhão para leishmaniose cutânea e 500.000 para leishmaniose visceral) (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010). A doença é endêmica em 98 países ou territórios, e estima-se que 350 milhões de pessoas residam em áreas de risco de infecção (GRIMALDI JÚNIOR. et al., 2012).

Uma forma de classificação da leishmaniose é sua divisão geográfica, em doença do Novo ou Velho Mundo. As espécies de *Leishmania* do Velho Mundo são endêmicas na África, Ásia, Oriente Médio e Mediterrâneo. No Novo Mundo, ocorre do Texas à América do Sul (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

A leishmaniose pode levar ao desenvolvimento de três formas clínicas em humanos: a leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea (BARRATT et al., 2010), havendo formas atípicas e variantes dentre estas três manifestações típicas (BAÑULS et al., 2011).

A apresentação clínica e sua gravidade dependem de fatores como a espécie de *Leishmania* envolvida, o local da inoculação, o número de parasitas inoculados e o estado imunológico do hospedeiro (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

Leishmaniose visceral é causada por *L. (L.) chagasi*, sinônimo para *L. (L.) infantum* (DANTAS-TORRES, 2007). É a forma mais agressiva da doença, invariavelmente fatal sem tratamento (BAÑULS et al., 2011). A LV promove um quadro de febre recorrente, caquexia, hepatoesplenomegalia e/ou linfadenopatias e pancitopenia, particularmente anemia (BARRATT et al., 2010).

Lesões cutâneas podem se desenvolver no local da picada do flebotomíneos (BAÑULS et al., 2011). O período de incubação do agente pode variar de semanas a anos (BARRATT et al., 2010). Sua verdadeira incidência pode ser subestimada pela falta ou erro de diagnóstico, sendo diagnosticada erroneamente como malária. Tais falhas no diagnóstico levam ao aumento de casos fatais (ALVAR et al., 2008).

Leishmaniose cutânea está relacionada no Novo Mundo à infecção por espécies como *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) pifanoi* e *L. (L.) garnhami* (BARRATT et al., 2010).

Manifesta-se tipicamente com úlceras bem delimitadas com bordas elevadas na pele. Manifestações atípicas incluem nódulos, placas ou pápulas (BARRATT et al., 2010). Geralmente são indolores se não houver infecção secundária, e podem se desenvolver de semanas a meses após a picada do vetor (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010). A LC pode ocorrer nas formas localizada ou difusa, dependendo de fatores inerentes aos agentes etiológicos e aos hospedeiros (BAÑULS et al., 2011).

A **leishmaniose mucocutânea** (LMC) é causada por algumas espécies de *Leishmania* restritas ao Novo Mundo. *L. (V.) braziliensis* é frequentemente associada, porém há relatos de envolvimento por *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* (BAÑULS et al., 2011).

Pode ocorrer concomitantemente à forma cutânea ou, mais comumente, de meses a anos após a cura das lesões da LC (BARRATT et al., 2010).

As lesões provocadas nas regiões mucosas criam um grande desconforto ao paciente pela desfiguração da face (BAÑULS et al., 2011). Se a doença evolui sem tratamento, promove mutilação e destruição das mucosas acometidas. Em geral, falhas no tratamento e recidivas são comuns (REVEIZ et al., 2013).

Normalmente, as lesões se desenvolvem a partir do local de inoculação pelo flebotomíneo iniciando-se como mácula, desenvolvendo-se para pápula e originando um nódulo que aumenta progressivamente e ulcera (REVEIZ et al., 2013).

2.2 Ciclo de vida do parasita

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam-se como amastigotas intracelulares no hospedeiro vertebrado, e promastigotas extracelulares em seus vetores biológicos, os insetos flebotomíneos (KAMHAWI, 2006).

A infecção do vetor ocorre pela ingestão de sangue contendo macrófagos infectados por formas amastigotas. No tubo alimentar do vetor, as amastigotas diferenciam-se em pequenas promastigotas procíclicas com flagelos curtos, e iniciam sua multiplicação (KAMHAWI, 2006).

As promastigotas procíclicas aderem ao epitélio do tubo digestivo do flebotomíneo (KILLICK-KENDRICK, 1990), onde passam pela metaciclogênese, processo no qual sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, tornando-se metacíclicas. No processo perdem a capacidade de adesão ao epitélio intestinal do vetor. Destacando-se do epitélio, migram para a cavidade bucal do inseto, de onde são transmitidas ao hospedeiro durante o próximo repasto sanguíneo (BRASIL, 2010).

As formas metacíclicas são o estágio infectante, e são altamente adaptadas para a transmissão a mamíferos hospedeiros. Possuem flagelo alongado, e são resistentes à lise mediada por complemento (KAMHAWI, 2006).

A transmissão do protozoário para os hospedeiros é realizada pelo repasto sanguíneo de fêmeas infectadas de flebotomíneos. Estes vetores são flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (WHO, 2010).

As formas promastigotas de *Leishmania* são inoculadas no local da picada, onde penetram no interior de macrófagos, neutrófilos ou células dendríticas. Apesar de se relatar o processo de entrada do parasita no meio intracelular por fagocitose, acredita-se atualmente que este seja mais complexo, envolvendo uma série de complexas interações celulares entre parasita e hospedeiro (BARRATT et al., 2010).

Após formação do fagolisossomo na célula hospedeira, as promastigotas passam a apresentar flagelo interno inaparente e tornam-se formas amastigotas (BARRATT et al., 2010). Estas se reproduzem por fissão binária,

eventualmente destruindo a célula hospedeira e afetando diferentes tecidos (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

As lesões da LTA ocorrem devido à replicação de formas amastigotas do parasita nos fagócitos da pele. Na LV, as amastigotas replicam-se no interior dos fagócitos do fígado, baço e medula óssea, originando a doença. Já no caso da LMC, os protozoários migram da pele por meio da circulação sanguínea ou linfática até as membranas mucosas acometidas (BARRATT et al., 2010).

O estabelecimento da infecção depende de fatores como a resposta imunológica celular do hospedeiro e principalmente da especificidade do antígeno de *Leishmania*, associado à sua capacidade de interação com as células dendríticas do organismo infectado (SILVEIRA et al., 2009).

2.3 Leishmaniose Tegumentar Americana

Nas Américas, a leishmaniose cutânea é endêmica na área entre o México e Argentina, onde recebe o nome de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A estimativa do número de casos humanos varia entre 187.200 a 307.800 (REVEIZ et al., 2013).

A LTA pode ser a manifestação clínica de leishmaniose de mais difícil diagnóstico devido à grande possibilidade de formas atípicas de lesões (BAÑULS et al., 2011). O diagnóstico diferencial inclui esporotricose, ectima, blastomicose, neoplasia, infecção atípica por micobactéria, sarcoidose, tuberculose cutânea, miíase, reação à picada de insetos e antraz cutâneo (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

Entre seus diversos agentes etiológicos, *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o de maior frequência e distribuição geográfica. Ainda assim, seu ciclo de vida ainda não está completamente elucidado devido a grande variação de espécies de vetores, hospedeiros, reservatórios e biótopos envolvidos (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

A doença causada por esta espécie de protozoário inicialmente relacionava-se ao meio silvestre, estando associada à penetração humana em áreas florestais (DANTAS-TORRES, 2007). Por isso, acredita-se que animais silvestres sejam seus reservatórios naturais (QUARESMA et al., 2011).

A interferência humana em áreas naturais levou à adaptação dos ciclos de transmissão a estes novos ambientes, observando-se a ocorrência da LTA também em áreas rurais ou urbanas (FALQUETO et al., 2003; SCHALLIG et al., 2007).

Além da adaptação dos vetores, para manutenção do ciclo de transmissão, sugere-se que animais sinantrópicos e domésticos tenham assumido o papel de reservatórios nestes locais (DANTAS-TORRES, 2007).

Acredita-se que estes novos ciclos de transmissão sejam mantidos por um conjunto de espécies de pequenos mamíferos sinantrópicos como roedores e marsupiais no caso da LTA (BRANDÃO-FILHO et al., 2003).

Atualmente, apesar de animais sinantrópicos como o rato-preto (*Rattus rattus*) haverem sido identificados como reservatórios da LTA na transmissão urbana e peri-urbana, os reservatórios naturais de *L. (V.) braziliensis* ainda não são bem conhecidos (QUARESMA et al., 2011).

2.4 O cão e a leishmaniose

O cão é apontado como principal responsável pela disseminação e manutenção da LV no meio doméstico (GRIMALDI JÚNIOR et al., 2012). Entretanto, medidas de controle da doença baseadas apenas na eutanásia de cães soropositivos não resultaram em interrupção do ciclo zoonótico da doença em seus locais de implantação (DIETZE et al., 1997; GRIMALDI JÚNIOR et al., 2012), sugerindo que este não seja o principal reservatório em meio doméstico, apesar de obviamente auxiliar na manutenção do ciclo de transmissão (DANTAS-TORRES et al., 2007).

Quanto a sua participação no ciclo de transmissão da LTA, esta ainda é controversa. Enquanto alguns autores defendem a ideia de que o cão seja reservatório também para a LTA, outros afirmam que isto não ocorre, já que sua infecciosidade para flebotomíneos antropofílicos é aparentemente baixa (FALQUETO et al., 2003; DANTAS-TORRES, 2007).

A carga parasitária na pele de cães infectados com *L. (V.) braziliensis* é baixa se comparada a de humanos infectados (PADILLA et al., 2002). Sua infecciosidade para flebotomíneos transmissores da LTA também mostrou-se

baixa, sendo observada infecção desses vetores somente em condições experimentais onde o repasto sanguíneo foi feito diretamente na lesão. Na pele íntegra dos animais infectados não observou-se infecção dos flebotomíneos (VEXENAT; BARRETTO; ROSA, 1986).

Segundo o Ministério da Saúde, não são recomendadas ações de controle dos animais domésticos ou silvestres com LTA, já que estes não são entendidos como reservatórios desta manifestação de leishmaniose. Por outro lado, o tratamento dos animais acometidos não é permitido com drogas para tratamento humano da doença, a fim de evitar resistência parasitária a estes fármacos (BRASIL, 2010).

Assim, os animais sintomáticos para LTA convivem lesões dolorosas e passíveis de contaminação secundária até que ocorra autocura ou agravamento, comprometendo seu bem estar (BARRATT et al., 2010). Além disso, as lesões ficam expostas aos flebotomíneos em áreas peridomiciliares, possibilitando a infecção destes vetores, ainda que em baixas proporções (VEXENAT; BARRETTO; ROSA, 1986).

2.5 Diagnóstico canino

Um diagnóstico de LTA baseado apenas em aspectos clínicos e epidemiológicos não é preciso, já que podem coexistir em áreas endêmicas outras doenças que apresentem lesões de aspectos similares como a esporotricose, úlceras bacterianas, carcinoma e lepra (GARCIA et al., 2007).

Para ser confiável, a confirmação da infecção por *Leishmania* frequentemente requer métodos integrados de diagnóstico clínico e testes laboratoriais específicos. O diagnóstico clínico deve ser baseado no histórico do animal, exame físico minucioso e exames de rotina como hemograma e perfis bioquímicos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose pode ser feito por métodos parasitológicos, imunológicos ou sorológicos (BRASIL, 2010).

Métodos parasitológicos incluem o esfregaço de aspirados do baço, medula óssea, linfonodos, fígado e isolamento em cultura ou em animais susceptíveis. O diagnóstico por meio de inoculação animal, utilizado com

sucesso para o diagnóstico de infecções por outras espécies de *Leishmania*, não mostra efetividade para o diagnóstico de infecções por *L. (V.) braziliensis* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003). Estes não são considerados os métodos de eleição, já que seu resultado pode ser influenciado pela prática do examinador, presença de infecção secundária e a não observação do parasita não exclui a possibilidade de infecção do animal (MEDEIROS et al., 2008). A probabilidade deste tipo de diagnóstico diminui com a evolução da doença, sendo raro após um ano (BRASIL, 2010).

Dentre os exames imunológicos, podem ser realizados testes sorológicos como a IFI (Imunofluorescência Indireta) e ELISA (Ensaio Imunoenzimático). A IFI não deve ser utilizada como único teste para diagnóstico da LTA, devendo ser associada a exames parasitológicos por sua baixa especificidade (BRASIL, 2010). Já a técnica de ELISA apresentou maior sensibilidade se comparada aos diagnósticos realizados por meio de IFI, pesquisa de *Leishmania* em biópsia de pele ou mucosa e PCR (FERREIRA et al., 2006).

Como exame molecular, a PCR vem se tornando um importante método de diagnóstico, já que possui alta sensibilidade e permite um diagnóstico preciso da espécie de parasita envolvida (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010). Este teste mostrou-se mais sensível que a microscopia direta para detecção do parasita em humanos com leishmaniose cutânea provocada por *Leishmania major* (ANDRESEN et al., 1996).

2.6 Tratamento

As variáveis inerentes à ocorrência da LTA ainda são fatores limitantes para seu tratamento. Isto se deve ao polimorfismo de suas manifestações clínicas, a variedade de espécies causadoras e diversidade dos ciclos de transmissão e áreas geográficas (ROMERO et al., 2001).

Atualmente, os fármacos de eleição para o tratamento da LTA humana são os antimoniais pentavalentes (BUMB; SATOSKAR, 2011). Sua atividade leishmanicida se deve à interferência que provocam na glicólise e oxidação dos ácidos graxos nas formas amastigotas de *Leishmania*. Dois fármacos podem

ser empregados para o tratamento – o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, porém apenas o primeiro é comercializado no Brasil (BRASIL, 2010).

Essas drogas apresentam elevada toxicidade para os pacientes, e sua administração é dificultada por requerer via intravenosa ou intramuscular, e resistência parasitária vem sendo relatada por todo o mundo (BUMB; SATOSKAR, 2011).

A dose e duração do tratamento variam de acordo com a manifestação da LTA (cutânea, difusa ou mucocutânea). A duração mínima recomendada é de 20 dias (30 para a LMC). Para padronização do tratamento, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose do antimonial seja calculada em mg/kg/dia (ROMERO et al., 2001).

A utilização do antimoniato de N-metilglucamina não é recomendada em pacientes acima de 50 anos, gestantes, cardiopatas, nefropatas, hepatopatas e portadores de Doença de Chagas (BRASIL, 2010). Nestes casos, entre os fármacos de segunda escolha está a anfotericina B, antibiótico com ação leishmanicida em modelos experimentais, porém sua ação em humanos ainda não é bem esclarecida (BUMB; SATOSKAR, 2011).

Antifúngicos como fluconazol, cetoconazol e itraconazol vêm sendo propostos para o tratamento da leishmaniose cutânea (BUMB; SATOSKAR, 2011).

2.7 Furazolidona

A furazolidona é um derivado nitrofurano utilizado há mais de 40 anos para o tratamento de infecções em humanos e animais, devido à sua atividade antibacteriana e antiprotozoária (ALI, 1999). Sua principal utilização para humanos está no tratamento de tricomoníase, cólera, giardíase, e infecções por *Helicobacter pylori* (GRAHAM et al., 2000; REIMÃO; TANIWAKI; TEMPONE, 2010).

Esta droga sofre considerável metabolização intestinal. Seus metabólitos no intestino podem inibir algumas funções intestinais, como transporte de sódio

(ALI, 1999). Sua biotransformação é hepática, e excreção renal (VROOMEN et al., 1990).

Como efeitos adversos, estudos realizados com aves de produção relatam principalmente degenerações no sistema reprodutivo masculino e feminino (ALI, 1999), sinais neurológicos (ZAMAN et al., 1995) e hepatotoxicidade (ARBID; HABBAK; HANAFY, 1990).

Em testes *in vitro*, a furazolidona mostrou atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) chagasi*. Tal atividade está relacionada a alterações morfológicas e perda de organelas, principalmente na membrana nuclear e mitocôndria (REIMÃO; TANIWAKI; TEMPONE, 2010).

2.8 Domperidona

A domperidona é um antagonista de receptores D₂ utilizado em humanos e animais por seus efeitos gastrocinéticos e antieméticos (MEULDERMANS, et al., 1981).

Esta droga ativa a resposta imune celular por promover um aumento da concentração de prolactina sérica. Além de sua principal função como estimulante da produção de leite em mamíferos, a prolactina é classificada como uma citocina pró-inflamatória derivada de linfócitos, possuindo assim papel central na resposta imune (HINTERBERGER-FISCHER, 2000).

Em estudo realizado por Gómez-Ochoa et al. (2009), a domperidona apresentou eficácia na redução de sinais clínicos e título de anticorpos em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum*.

Sua metabolização é hepática, e excreção é principalmente fecal, porém também urinária (MEULDERMANS et al., 1981).

3. REFERÊNCIAS

- ALI, B. H. Pharmacological, therapeutic and toxicological properties of furazolidone: some recent research. **Veterinary Research Communications**, v. 23, n. 6, p. 343-360, 1999.
- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.
- ANDRESEN, K. et al. Evaluation of the Polymerase Chain Reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90, n.2, p. 133-135, 1996.
- ARBID, M. S.; HABBAK, M. M.; HANAFY, M. S. Toxicological and biological studies on Japanese quails fed graded levels of furazolidone. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 38, n. 4, p. 271-279, 1990.
- BAÑULS, A. L. et al. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1451-1461, 2011.
- BARRATT, J. L. N. et al. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 795-836, 2010.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 10, p. 1278-1286, 2009.
- BUMB, R. A.; SATOSKAR, A. R. Radiofrequency-induced heat therapy as first-line treatment for cutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 9, n. 6, p. 623-625, 2011.
- CUPOLILLO, E. et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3126-3132, 2003.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DIETZE, R. et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 1240-1242, 1997.

FALQUETO, A. et al. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viania) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1003-1010, 2003.

FERREIRA, M. P. et al. Sensitivity of an immunoenzymatic test for the detection of anti-*L. braziliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 215-217, 2006.

GARCIA, A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 368-371, 2007.

GÓMEZ-OCHOA, P. et al. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 259-263, 2009.

GRAHAM, D. Y. et al. Furazolidone combination therapies for *Helicobacter pylori* infection in the United States. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 14, n. 2, p. 211-215, 2000.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, 2005.

GRIMALDI JÚNIOR, G. et al. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 6, p. 966-971, 2012.

HINTERBERGER-FISCHER, M. Prolactin as pro-inflammatory cytokine – considerations on consolidated immunotherapy after high dosage therapy. **Acta Medica Austriaca Supplement**, v. 52, p. 16-20, 2000.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends of foes? **TRENDS in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1990.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p. 43-50, 2008.

MEULDERMANS, W. et al. On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man III. Comparative study on the excretion and metabolism of domperidone in rats, dogs and man. **European Journal of the Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 6, n. 1, p. 49-60, 1981.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 309-322, 2010.

PADILLA, A. M. et al. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 110, n. 1-2, p. 1-10, 2002.

QUARESMA, P. F. et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 579-585, 2011.

REVEIZ, L. et al. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: a systematic review update. **Plos One**, v. 8, n. 4, e61843, 2013.

REIMÃO, J. Q.; TANIWAKI, N. N.; TEMPONE, A. G. Furazolidone is a selective *in vitro* candidate against *Leishmania (L.) chagasi*: an ultrastructural study. **Parasitology Research**, v. 106, n. 6, p. 1465-1469, 2010.

ROMERO, G. A. S. et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 456-465, 2001.

SCHALLIG, H. D. F. H. et al. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 3, p. 387-393, 2007.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n.8, p. 423-431, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

TEMPONE, A. G. et al. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. x, p. 159-163, 2010.

VEXENAT, J. A.; BARRETTO, A. C.; ROSA, A. C. O. C. Infecção experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 1, p. 125-126, 1986.

VROOMEN, L. H. M. et al. *In vivo* and *in vitro* metabolic studies of furazolidone: a risk evaluation. **Drug Metabolism Reviews**, v. 22, n. 6-8, p. 663-676, 1990.

ZAMAN, Q. et al. Experimental furazolidone toxicosis in broiler chicks: effect of dosage, duration and age upon clinical signs and some blood parameters. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 43, n. 2-3, p. 359-367, 1995.

WHO - World Health Organization. **Control of the leishmaniasis**. WHO Technical Report Series 949, 2010. 201 p.

**4. CAPÍTULO 1: TRATAMENTO CLÍNICO DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA COM FURAZOLIDONA E
DOMPERIDONA**

Short communication submetido ao periódico International Journal of Antimicrobial Agents

Stela Rechinelli Passos^a, Tadeu de Azevedo Rodrigues^a, Ana Paula Madureira^b, Marcos Santos Zanini^{a,*}

^aLaboratório de Microbiologia e Zoonoses, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, s/nº, Guararema, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brazil.

^b Departamento de Engenharia de Biosistemas da Universidade Federal de São João Del Rei, MG, Brasil, CEP 36,301-160

*Autor para correspondência.

E-mail: marcos.zanini@ufes.br (M.S. Zanini)

5.1. Abstract

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a public health problem in countries of sub-tropical America. Euthanasia of dogs affected is not obligatory as in visceral leishmaniasis, though treatment with drugs for human treatment is prohibited and there is no treatment recommended. The aim of this study was to evaluate the efficacy of treatment with furazolidone and domperidone in dogs naturally infected and symptomatic for ACL caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Confirmation of infection was performed by PCR and parasite culture from tissue collected from wound limit. After adaptation period of 60 days, the animals were divided into a control group (n = 4) and treated group (n = 8). The treated group received furazolidone treatment for 21 days interspersed with domperidone for 10 days. The dogs that showed no wound healing during this period received again the same treatment cycle up to 93 days. Among the eight treated animals, only one dog showed no wound healing after treatment. For evaluation of recurrence of lesions of treated animals or self-healing of the control group, all animals were observed for 12 months after treatment. There was no recurrence of injury to the animals in it was healed, neither self-healing in the control group during this period. The animal that received no clinical cure showed reduction of wound measures after treatment completion. Our data suggest that treatment with furazolidone and domperidone is effective for symptomatic dogs for ACL caused by *L. (V.) braziliensis*.

Keywords: *Leishmania*, treatment, domperidone, furazolidone, dogs, skin ulcers.

5.2. Resumo

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é um problema de saúde pública em países da América subtropical. A eutanásia de cães infectados não é obrigatória como na leishmaniose visceral, e o tratamento desses animais com fármacos utilizados para tratamento humano da leishmaniose é proibido. Objetivou-se com o presente estudo avaliar a eficácia do tratamento com

furazolidona e domperidona em cães sintomáticos para LTA causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A confirmação da infecção foi realizada por cultura do parasita a partir de amostra de tecido coletada da borda da lesão e PCR de amostra da cultura. Após um período de adaptação de 60 dias, os animais foram divididos em grupo controle (n = 4) e grupo tratado (n = 8). O grupo tratado recebeu furazolidona durante 21 dias, intercalada com domperidona durante 10 dias. Os cães que não mostraram remissão da lesão durante este período receberam novamente o mesmo ciclo de tratamento até um total de 93 dias. Entre os oito animais tratados, sete (87,5%) apresentaram remissão da ferida após o tratamento. O animal que não obteve cura clínica apresentou redução de medidas da lesão 93 dias de tratamento. Todos os animais foram observados durante 12 meses após o início da administração dos fármacos. Não observou-se recidiva de lesões nos animais em que houve sua remissão ou autocura nos animais do grupo controle durante este período. Nossos dados sugerem que o tratamento com furazolidona e domperidona é eficaz para o tratamento das lesões de cães sintomáticos para LTA causada por *L. (V.) braziliensis*.

Palavras-chave: *Leishmania*, tratamento, domperidona, furazolidona, cães, úlcera.

5.3. Introdução

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é um problema de saúde pública em países da América sub-tropical. No Brasil, a doença ocorre em todo o território, e o agente etiológico responsável pelo maior número de casos é *Leishmania (Viannia) braziliensis* [1].

Apesar de o cão ser reservatório para *L. (L.) infantum*, o mesmo não parece ocorrer para *L. (V.) braziliensis*, pois aparentemente sua infecciosidade para flebotomíneos antropofílicos é baixa [2].

No Brasil, a eutanásia de animais domésticos e silvestres não é aceita como medida de controle para LTA, porém o tratamento de animais infectados com fármacos com a mesma finalidade em humanos não é permitido a fim de evitar resistência parasitária [1].

Assim, animais sintomáticos vivem com lesões dolorosas e passíveis de contaminação secundária [3], sem opção de tratamento.

Objetivou-se com este estudo avaliar a eficácia da furazolidona e domperidona para o tratamento clínico de cães sintomáticos e naturalmente infectados por *L. (V.) braziliensis*.

5.4. Material e métodos

5.4.1. Animais

Foram utilizados 12 cães com lesões características de LTA, identificados inicialmente pela Vigilância Sanitária do município de Íluna. Os animais não possuíam raça definida, pertenciam a ambos os sexos e apresentavam idade entre cinco e 12 anos. Os procedimentos descritos no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFES (CEUA-UFES), sob o nº 013/2012.

Os cães foram divididos em um grupo controle (n=4) que não recebeu tratamento e permaneceu em suas residências no município de Íluna; e um grupo tratado com furazolidona e domperidona (n=8), que foi mantido em canil particular durante o tratamento.

Todos os cães utilizados no projeto foram submetidos a um período de adaptação de 60 dias, nos quais começaram a receber ração com teor de

proteína bruta 21%, desverminação com associação de febantel, pamoato de pirantel e praziquantel, e eliminação de ectoparasitas com fipronil. Coletou-se sangue para verificação quanto a infecção por hemoparasitas (babesiose, anaplasiose e erliquiose), realização de hemograma completo, perfil renal (creatinina e ureia) e perfil hepático (TGO, TGP, GGT e albumina).

5.4.2. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* foi realizado por meio de cultura do parasita e PCR da cultura, realizada a partir amostra coletada por raspado de tecido da borda da lesão dos animais sedados com associação de quetamina (15 mg/kg IM) e xilazina (2 mg/kg IM) e anestesia local com 1 ml de lidocaína a 2%. Para detecção do parasita nos animais, realizou-se quatro coletas durante o experimento: antes do início do tratamento (dia 0), e nos dias 120, 240 e 360.

A amostra foi armazenada em microtubo plástico com solução fisiológica e associação de penicilina e estreptomicina até realização de cultura em meio Novy, MacNeal e Nicolle e Liver Infusion Triptose (NNN/LIT). As culturas foram mantidas em estufa incubadora refrigerada com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.), a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 30 dias [4]. Após este período as formas promastigotas foram avaliadas por microscopia de luz e submetidas a identificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) para identificação da espécie do protozoário [5], utilizando *primers* B1 e B2 para amplificação de fragmentos de 750 bp [6].

5.4.3. Tratamento

Verificou-se que a furazolidona em doses de 50 mg/kg/dia [7] provoca efeitos colaterais como debilidade de membros pélvicos e anorexia em cães com até sete dias de tratamento. O mesmo foi observado em dados não publicados para a dose de 40 mg/kg/dia. Assim, utilizou-se no presente estudo 35 mg/kg/dia do fármaco administrados por via oral, fracionados em duas administrações a cada 12 horas (Giarlam® comprimidos 200 mg).

A domperidona foi administrada na dose de 1 mg/kg a cada 12 horas, por via oral (Motilium® comprimidos 10 mg) durante 10 dias [8].

Todos os animais utilizados no experimento tiveram suas lesões mensuradas com paquímetro nas duas regiões de maior comprimento no dia 0 (antes do início do tratamento). As mensurações no grupo controle foram realizadas novamente no dia 93. No grupo tratado, as lesões foram aferidas semanalmente, juntamente com a pesagem para ajuste de dosagem até o dia 93.

A administração dos fármacos foi realizada em ciclos de 31 dias. Os cães receberam furazolidona nos 21 dias iniciais e domperidona nos 10 dias finais de cada ciclo. Os animais que não apresentaram remissão da lesão neste período receberam novamente o ciclo de tratamento até manifestação do efeito desejado, por até três ciclos, totalizando 93 dias.

Como os fármacos utilizados apresentam metabolização hepática e excreção renal, após o tratamento os animais foram avaliados novamente com hemograma completo, perfil renal e hepático.

Todos os animais foram acompanhados durante o período de 12 meses a partir do dia 0 de tratamento para avaliação de possível recidiva das lesões ou autocura dos animais do grupo controle.

5.4.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prisma 5.0 (Graph Prism Inc., San Diego, CA). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM ou mediana (intervalo interquartil), quando apropriado.

O teste de normalidade de Shapiro & Wilk foi realizado para testar a hipótese nula de que os erros amostrais apresentavam-se normalmente distribuídos (Shapiro & Wilk, 1965). Quando os dados não se desviaram de uma distribuição Gaussiana ($p > 0,05$), foram avaliados utilizando o teste t pareado. Caso contrário, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon (W), teste de Mann-Whitney (U) e teste exato de Fischer, quando apropriado. $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

5.5. Resultados e discussão

5.5.1. Animais

O período de adaptação 60 dias mostrou-se relevante para padronizar as condições sanitárias, nutricionais e imunológicas dos cães. Os animais foram tratados quanto a infecção e infestação por parasitas.

Com esta padronização, foi oportunizada a manifestação de autocura dos animais propensos, o que não ocorreu em nenhum dos animais avaliados. Este fato indica que a cura clínica das lesões foi relacionada à ação dos fármacos.

5.5.2. Exames laboratoriais

Os principais achados hematológicos iniciais foram trombocitopenia em 50% dos animais, eosinofilia (25%) e anemia (8,33%). Outros autores [9] observaram também para LTA trombocitopenia em 82,4% dos cães estudados, eosinofilia (41,2%) e anemia (70,6%).

Avaliando padrões hematológicos para LV canina, Medeiros et al. (2008) [10] relataram valor muito próximo ao do presente estudo de trombocitopenia (53,1%). Já para os outros achados hematológicos como anemia e eosinofilia, verificaram 60% e 8,9% dos animais, respectivamente. Dias et al. (2008) [11] relataram anemia em 27,27% dos cães, e eosinofilia em 40,9%, não verificando trombocitopenia.

Não se deve descartar que a trombocitopenia observada no presente estudo decorra da infecção por hemoparasitas, já que apenas o esfregaço sanguíneo não fornece um diagnóstico preciso da infecção [12].

Os exames bioquímicos revelaram ALT acima dos valores de normalidade em 33,33% dos animais avaliados, assim como GGT elevada em 66,66% já para Dias et al. (2008) [11] verificou-se aumento nos níveis séricos de ALT e AST em 63,63% dos animais sem alterações nos valores de GGT. Para uréia em nosso estudo 16,66% dos animais apresentaram valores abaixo da referência enquanto os autores citados acima observaram em 22,72% dos animais avaliados.

São necessários mais estudos que determinem os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais sintomáticos para LTA, a fim de elucidar os reais efeitos dos fármacos sobre o organismo dos animais tratados, levando-se em consideração os efeitos da infecção nestes animais.

5.5.3. Diagnóstico

A identificação por cultura do parasita em meio NNN-LIT e os resultados da técnica de PCR, com ampliação de fragmento de 750 bp a partir de amostras de tecido confirmaram a infecção por *L. (V.) braziliensis*, permitindo a inclusão dos cães no presente estudo.

A cultura das amostras coletadas para análise ao longo do presente estudo nos animais do grupo tratado não detectaram o parasita. Entretanto, por meio da técnica de PCR aplicada ao raspado de tecido cicatricial, pôde-se constatar existência de material genético de *L. (V.) braziliensis* para todos os animais do grupo tratado em todas as coletas durante o presente estudo.

Mesmo não ocorrendo cura estéril dos animais tratados [8], a remissão da lesão é de grande importância por evitar a possível contaminação de vetores que se alimentem diretamente da mesma [13]. A persistência do parasito foi observada após a cura clínica das lesões em humanos [1]. Entretanto em estudo de xenodiagnóstico realizado por Vexenat, Barretto e Rose (1986) [13] para os flebotomíneos (*Lutzomyia whitmani*) que realizaram repasto sanguíneo em áreas de pele íntegra dos cães acometidos por LTA, nenhum dos 180 flebotomíneos desenvolveu formas promastigotas no tubo digestório. Já para os vetores que realizaram repasto diretamente da lesão, as porcentagens de infecção foram de 1,8% para cães infectados naturalmente, e 8,3% para cães infectados experimentalmente.

5.5.4. Tratamento

Entre os oito animais tratados no experimento, sete (87,5%) apresentaram remissão total da lesão (Figura 1). O cão no qual a cicatrização não foi observada após os 93 dias de tratamento possuía idade avançada. Possivelmente a ausência de remissão da ferida deve-se a imunossupressão esperada em animais idosos.



Figura 1 – Imagem das feridas após o período de adaptação (coluna da esquerda) e tecido cicatricial (coluna da direita) após tratamento de (a) 30 dias. (b) 27 dias. (c) 21 dias. (d) 65 dias.

FONTE: Arquivo pessoal.

Sugere-se que a remissão de lesões na maioria dos animais após tratamento deveu-se a atividade leishmanicida da furazolidona observada *in vitro* por Reimão, Taniwaki e Tempone (2010) [14]; aliada à atividade imunoestimulante da domperidona [8], uma vez que o curso da leishmaniose depende do *status* imunológico do animal [1].

Utilizando a furazolidona, Tempone et al. (2010) [7] obteve redução de sinais clínicos no tratamento de hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* após 12 dias da administração do fármaco. Dosagens inferiores e em menor espaço de tempo talvez tenham sido os motivos do insucesso para o tratamento em humanos realizados por Costa et al. (1985) [15], que utilizaram a dose de 8 mg/kg/dia durante dez dias.

Para o tratamento sintomático de cães com leishmaniose visceral, Gómez-Ochoa et al. (2009) [8] obtiveram sucesso ministrando domperidona aos animais após 30 dias de tratamento.

Todos os cães apresentaram perda progressiva de peso nos períodos de administração da furazolidona. Três animais que receberam mais de um ciclo de tratamento passaram a apresentar efeitos colaterais ao fármaco como anorexia, perda de peso, debilidade nos membros posteriores e incoordenação em média aos 18 dias no segundo ciclo de tratamento e 14 dias no terceiro. Observados os efeitos colaterais ao uso da furazolidona, sua administração foi interrompida nesses animais até o fim dos 21 dias previstos para o ciclo do fármaco, quando seguiu-se normalmente o tratamento previsto com a domperidona, até os 93 dias de tratamento.

5.5.5. Acompanhamento pós-tratamento

Os animais foram observados por um período de 12 meses desde o início do tratamento. Os sete cães do grupo tratado nos quais houve cicatrização foram observados quanto à recidiva das lesões, e os animais do grupo controle quanto à manifestação de autocura. Tais eventos não foram observados em nenhum dos animais. O animal que não apresentou cura clínica apresentou diminuição das mensurações da lesão após término do tratamento, demonstrando que mesmo que sua cicatrização não tenha ocorrido, a administração dos fármacos contribuiu para sua redução.

5.5.6. Análise estatística

Por meio das mensurações realizadas das feridas dos animais (Anexo A), observou-se que o número médio de dias para remissão da ferida variou entre os animais tratados (49,88 dias \pm 10,37) e não tratados (91,0 \pm 0,0 dias) utilizando o teste de t não pareado= 2,57 (p = 0,027). Isto mostra que, em média, duas sessões de furazolidona e domperidona levam à completa remissão da lesão nos animais.

Pôde-se notar ainda que a furazolidona [mediana= -0.12 cm² (-0.46 a -0.03 intervalo interquartil)] mostrou uma redução significativa (Mann-Whitney U=53,50; p=0,004) da ferida entre o início e final de cada ciclo de tratamento, diferente da fase da domperidona que simplesmente estabilizou a ferida [mediana= -0.0 cm² (-0.07 a -0.07 intervalo interquartil)].

Observou-se que o tamanho inicial e final da lesão diferiu estatisticamente entre os animais tratados [início = 0,77 (0,98 a 0,25); final= 0,0 (0,0 a 0,0)] (W = 36; p = 0.008), mas não entre os animais do grupo controle [início=1,11 (0,61 a 1,63); final=0,78 (0,33 a 1,57)] (W = 2; p=0,875), mostrando que houve remissão do tamanho da lesão no grupo tratado. Além disso, pode ser comprovada a existência de uma associação entre a cicatrização de feridas e tratamento utilizado por meio de um teste Exato de Fisher (p=0,01).

Nossos dados sugerem que o tratamento com furazolidona e domperidona é efetivo para o tratamento clínico de cães sintomáticos para LTA causada por *L. (V.) braziliensis*.

5.6. Referências

- 1 BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília : Editora do Ministério da Saude, 2010. 180 p.
- 2 Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; 149:139-146.
- 3 Bañuls AL, Bastien P, Pomares C, Arevalo J, Fisa R, Hide M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:1451-1461.
- 4 Rocha RDR, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, Carvalho AT, Corrêa-Oliveira R, Marques MJ et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa de leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35:551-562.
- 5 de Bruijn, MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 1992; 52:45-58.
- 6 Mendonça MG, de Brito ME, Rodriguez EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American Cutaneous Leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 2004; 189:1018-1023.
- 7 Tempone AG, Mortara RA, Andrade Jr HF, Reimão JQ. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36:159-163.

8 Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J* 2009; 179:259-263.

9 Figueredo LA, Paiva-Cavalcanti M, Almeida EL, Brandão-Filho SP, Dantas-Torres F. Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*-infected dogs from Pernambuco, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21:418-420.

10 Medeiros CMO, Melo AGC, Lima AKF, Silva ING, Oliveira LC, Silva MC. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. *Cienc Anim* 2008; 18:43-50.

11 Dias EL, Batista ZS, Guerra RMSNC, Calabrese KS, Lima TB, Abreu-Silva AL. Canine visceral leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão State, Brazil. *Cienc Anim Bras* 2008; 9:740-745.

12 Moya-Araujo CF, Batista GDH, Ribeiro MG, Sturion TT, Araújo DC, Araújo Júnior JP. Correlation of clinical and hematological with definitive diagnosis of canine ehrlichiosis by PCR. *Semina Ciênc Agrar* 2012; 33:2301-2306.

13 Vexenat JA, Barretto AC, Rosa ACOC. Infecção experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81:125-126.

14 Reimão JQ, Taniwaki NN, Tempone AG. Furazolidone is a selective *in vitro* candidate against *Leishmania (L.) chagasi*: an ultrastructural study. *Parasitol Res* 2010; 106:1465-1469.

15 Costa JML, Sampaio RN, Tada MS, Almeida EA, Veiga EP, Magalhães AV et al. Furazolidone treatment of cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79:274.

ANEXOS

ANEXO A – Tabela 1

TABELA 1 – Medidas das lesões ao longo do tratamento dos animais.

Animal	0	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias	56 dias	63 dias	70 dias	77 dias	84 dias	91 dias	93 dias
Grupo tratado															
1	2 x 1,5	1,7 x 1,4	1,5 x 1,4	1,4 x 1,4	1,5 x 1,4	1,6 x 1,4	1,5 x 1,4	1,3 x 1,5	1,7 x 1,4	1,8 x 1,0	1,8 x 0,9	1,5 x 1,1	1,3 x 1,1	1,4 x 1,1	1,4 x 1,1
2	1 x 0,4	0,7 x 0,2	0,5 x 0,2	0,2 x 0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0,3 x 0,5	0,3 x 0,5	0,2 x 0,5	0,2 x 0,4	0,4 x 0,4	0,4 x 0,4	0,3 x 0,3	0,3 x 0,2	0,3 x 0,3	0,4 x 0,3	0,3 x 0,2	0,3 x 0,2	0,3 x 0,1	-	-
4	0,5 x 0,4	0,4 x 0,2	0,3 x 0,2	0,2 x 0,2	0,3 x 0,2	0,5 x 0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1,2 x 0,8	0,9 x 0,7	0,8 x 0,5	0,5 x 0,1	0,2 x 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1 x 0,6	0,7 x 0,4	0,3 x 0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1,9 x 0,5	1,8 x 0,5	1,9 x 0,5	1,9 x 0,5	1,9 x 0,5	1,7 x 0,4	1,4 x 0,4	1,1 x 0,4	1,1 x 0,4	1,0 x 0,4	0,7 x 0,3	0,6 x 0,3	0,4 x 0,2	-	-
8	0,9 x 1,1	0,9 x 1,1	0,7 x 1,0	0,6 x 0,9	0,5 x 0,9	0,3 x 0,6	0,2 x 0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo controle															
9	1 x 0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9 x 0,9
10	1,1 x 0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5 x 0,5
11	1,3 x 1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4 x 1,3
12	1,7 x 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9 x 1

¹ O período de administração da furazolidona evidenciado em azul, e domperidona evidenciado em rosa.

² Em cinza, momento da cicatrização da ferida.

³ Em amarelo, observa-se os dois momentos de mensuração realizada no grupo controle.