

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

MÁRCIO PAIVA BARCELLOS

**USO DA FURAZOLIDONA NO TRATAMENTO CLÍNICO
DE CÃES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

ALEGRE-ES

2013

MÁRCIO PAIVA BARCELLOS

**USO DA FURAZOLIDONA NO TRATAMENTO CLÍNICO
DE CÃES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

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 e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Santos Zanini

ALEGRE-ES

2013

Barcellos, Márcio Paiva, 1980-

B242u Uso da furazolidona no tratamento clínico de cães com leishmaniose tegumentar americana/ Márcio Paiva Barcellos. – 2013. 77 f. : il.

Orientador: Marcos Santos Zanini.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Leishmania (V.) braziliensis. 2. Terapia medicamentosa. 3. Cão – doenças. 4. Nitrofuranos. I. Zanini, Marcos Santos. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619

MÁRCIO PAIVA BARCELLOS

**USO DA FURAZOLIDONA NO TRATAMENTO CLÍNICO
DE CÃES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

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 e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Aprovada em __/__/2013.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcos Santos Zanini

**Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador**

Prof^a. Dr^a. Karina Preising Aptekmann

Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico a minha família que proporcionou os alicerces da minha caminhada fazendo com que esta seja objetiva e evolutiva.

AGRADECIMENTOS

A minha noiva Adriane por todo o suporte nos momentos de ausência.

As minhas queridas amigas Isabela, Karina, Graziela Barioni, que sempre me ajudaram e me deram apoio nessa jornada.

Ao meu grande amigo Fernandão pelos momentos agradáveis passados em Alegre.

Aos meus parceiros de mestrado e além de tudo grandes amigos, Adriano e Grazi.

Ao meu orientador Marcos Santos Zanini pela orientação e pela paciência.

Aos amigos de laboratório Evandro, Gabriela e Frederick por me ensinar e me ajudar ao longo deste trabalho.

A CAPES pela bolsa cedida no período de pós-graduação.

Muito obrigado a todos.

RESUMO

BARCELLOS, P. MARCIO. USO DA FURAZOLIDONA NO TRATAMENTO CLÍNICO DE CÃES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2013.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença difundida em diversos países e os derivados antimoniais pentavalentes são as drogas de escolha no tratamento desta enfermidade para humanos, porém como recomendado pelo Ministério da Saúde, é contra indicado para o tratamento em animais, justificando a busca de novas terapias para o tratamento da LTA em caninos. O objetivo deste trabalho foi testar o uso da furazolidona (FZ) no tratamento de lesões cutâneas em cães portadores de LTA. O estudo foi feito em nove cães com lesões da doença confirmados por técnicas de ELISA, biópsia para PCR e cultura para *Leishmania (V.) braziliensis*. O medicamento foi administrado via oral na dosagem de 20 mg/Kg a cada doze horas durante sete dias, em três etapas com intervalo de 10 dias, foram realizados exames laboratoriais para monitoramento dos padrões hematológicos e bioquímicos. A regressão da lesão foi observada em 77,77% dos animais, o que demonstrou o efeito terapêutico da droga no tratamento clínico das lesões dos cães com LTA.

Palavras chave: *Leishmania (V.) braziliensis*, terapia medicamentosa, cão - doenças nitrofuranos.

ABSTRACT

BARCELLOS, P. MARCIO. USO DA FURAZOLIDONA NO TRATAMENTO CLÍNICO DE CÃES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2013.

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a widespread disease in several countries. As recommended by the Brazilian Ministry for Health, a treatment of animals is contraindicated. The aim of this study was to test the use of furazolidone (FZ) to treat lesions in dogs suffering from ACL. The study was conducted with nine dogs with lesions and the presence of ACL as confirmed by ELISA and PCR for biopsy and culture for *Leishmania (V.) braziliensis*. The drug was administered orally in a concentration of 20 mg / kg every twelve hours for seven days, in three steps with an interval of 10 days, accompanied by laboratory monitoring of hematological and biochemical patterns. A regression of the lesion was observed in seven animals. FZ has proven an effective drug in the remission of lesions in dogs with ACL injury. Keywords: *Leishmania (V.) braziliensis*, drug therapy, dog – diseases, nitrofurans.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1-	Gráfico comparativo de dispersão do diâmetro de lesões tegumentares, no momento inicial, vigésimo e quadragésimo primeiro dia de tratamento de cães com LTA tratados com FZ.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1-	Relação entre diferentes espécies de <i>Leishmania</i> e sua forma clínica em diferentes áreas geográficas.....	16
Capítulo 1-		
Tabela 1-	Dados hematológicos dos cães (n=9) com LTA nos momentos pré (M1) e pós (M2) tratamento com furazolidona.....	40
Capítulo 2-		
Tabela 1-	Diversos tipos de tratamento para leishmaniose tegumentar, porcentagem de recidiva e período de recidiva no pós tratamento.....	58

LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

ACL	American Cutaneous Leishmaniasis
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µL/mL	Microlitro por mililitro
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
BID	De 12 em 12 horas
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
CEUA-UFES	Comitê de Ética em Experimentação Anima - Universidade Federal do Espírito Santo
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular médio
ct	Cutânea
D	Dias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAS	Elementos anormais de sedimentoscopia
EDTA	Ácido diaminotetracético - sal dissódico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ES	Espírito Santo
FA	fosfatase alcalina
FL	Flórida
FZ	Furazolidona
g/ mL	Gramas por mililitro
IDR	Intradermorreação
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2	Imunoglobulina G2
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-5	Interleucina 5
IL-8	Interleucina 8
<i>L.(V).braziliensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
<i>L.braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L.major-like</i>	<i>Leishmania major-like</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LIT	Liver Infusion Triptose
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose mucocutânea

LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MAO	Monoamina Oxidase
mc	Mucocutânea
mg/Kg	Miligrama por kilograma
mg/kg/IM	Milligrama por kilo e via Intra Muscular
mg/mg	Miligrama por miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
mM	MiliMolar
mm ²	Milímetros quadrados
NaCl	Cloreto de Sódio
ng/mL	Nanograma por mililitro
NNN	Novy, MacNeal, e Nicolle
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPT	Proteina plasmática total
<i>primers</i> B1 e B2	Iniciadores que amplificam sequência de 750 pares de bases
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
SFB	Soro fetal bovino
SRD	Sem raça definida
TH1	Linfócito <i>T helper</i> 1
TH2	Linfócito <i>T helper</i> 2
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UI/L	Unidade internacional por litro
USA	Estados Unidos da America
VCM	Volume corpuscular médio
WB	<i>Western Blot</i>
YGT	gama glutamil transferase

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
(±)	Varição para maior ou menor entre dois valores
(+)	Positivo
%	Por cento
(-)	Negativo
1:10	Diluição
=	Igual
p	Probabilidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	LEISHMANIOSE.....	16
2.2	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	17
2.3	OCORRÊNCIA DOS VETORES DA LTA NO ESPÍRITO SANTO.....	18
2.4	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA – DOENÇA CLÍNICA...	18
2.5	LTA - AUTO CURA.....	19
2.6	PERSISTÊNCIA DO MICROORGANISMO.....	19
2.7	IMUNOLOGIA.....	20
2.8	DIAGNÓSTICO DA LTA.....	21
2.8.1	Diagnóstico clínico	21
2.8.2	Diagnostico laboratorial	21
2.8.2.1	Pesquisa direta	21
2.8.2.2	Cultura de <i>Leishmania</i>	22
2.8.2.3	Metodologias para identificação da resposta imune humoral anti <i>Leishmania</i> como estratégia diagnóstica.....	22
2.8.2.3.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	22
2.8.2.3.2	<i>Immunoblotting</i> ou <i>Western Blot</i> (WB).....	23
2.8.2.3.3	Citometria de fluxo.....	24
2.8.2.4	Identificação de ácidos nucleicos.....	24
2.8.2.5	Outras técnicas para diagnóstico da LTA.....	25
2.9	TRATAMENTO PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	26
2.9.1	Antimoniais pentavalentes.....	26
2.9.2	Antifúngicos.....	27
2.9.3	Outras drogas.....	27
2.9.4	Terapias tópicas.....	28
2.9.5	A furazolidona.....	28
	CAPÍTULO 1	30

3	Cap. 1 – USO DA FURAZOLIDONA NO TRATAMENTO DE LESÕES EM CÃES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	30
3.1	RESUMO.....	30
3.2	ABSTRACT.....	31
3.3	INTRODUÇÃO.....	32
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.4.1	Seleção dos animais.....	33
3.4.2	Diagnóstico	33
3.4.3	Tratamento	37
3.4.3.1	Teste piloto para ajuste de dose.....	37
3.4.3.2	Grupo controle.....	37
3.4.3.3	Uso da FZ em cães enfermos.....	37
3.4.4	Avaliação laboratorial.....	38
3.4.5	Medição das lesões.....	39
3.4.6	Análise estatística.....	39
3.5	RESULTADOS.....	40
3.5.1	Achados laboratoriais.....	40
3.5.1.1	Hematologia	40
3.5.1.2	Bioquímica	42
3.5.1.3	Urinálise.....	43
3.5.2	Lesões cutâneas.....	44
3.6	DISCUSSÃO.....	46
3.7	REFERÊNCIAS.....	48
	CAPÍTULO 2.....	53
	Cap. 2 – LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA TRATAMENTO E	
4	RECIDIVA EM HUMANOS E ANIMAIS: UMA REVISÃO	53
4.1	RESUMO.....	53
4.2	ABSTRACT.....	54
4.3	INTRODUÇÃO.....	55
4.4	CONCLUSÃO.....	60
4.5	REFERÊNCIAS.....	60
5	CONCLUSÃO	66
6	REFERÊNCIAS.....	66

INTRODUÇÃO

Dados sobre a leishmaniose indicam esta doença presente em 98 países. A prevalência aproximada é de 12 milhões de casos humanos, tendo em média 60 mil mortes por ano no mundo (BRASIL, 2010). É causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, e transmitida por fêmeas de *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* spp no novo mundo, dividindo-se em leishmaniose visceral (LV) e outra forma que pode acometer a pele ou mucosa denominada leishmaniose tegumentar (LT) (BRASIL, 2010). A LT é mundialmente mais frequente e nas Américas ganha denominação de leishmaniose tegumentar americana (LTA) (MATTHEW et al. 2004; FALQUETO et al., 2003; SINGH e SIVAKUMAR, 2004; BRASIL, 2010).

O tratamento para LTA possui diversos aspectos a serem pesquisados, principalmente relacionados à toxicidade das drogas utilizadas, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos, a recidiva e a resistência dos microrganismos (LIMA et al., 2007).

Os antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses em humanos, havendo dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados, o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil (BRASIL, 2010, MAYRINK et al., 2006). O tratamento de cães com esses medicamentos não é permitido no Brasil, principalmente devido a uma possível formação de resistência do parasito ao medicamento (BRASIL, 2010). A proposta de um novo tratamento clínico dos cães com LTA, utilizando a furazolidona, vem como justificativa para realização deste trabalho.

Os constantes desafios na busca de novos medicamentos para a leishmaniose resultaram em descobertas, como o uso da furazolidona N-(5-nitro-2-furfuri1ideno)-3-amino-2-oxazolidona (FZ), um derivado nitrofurano com ação antibacteriana e antiprotozoária onde atua sobre organelas intracelulares (ALI, 1999). Inicialmente acreditava-se que a FZ possuía ação inibitória na monoamina oxidase (MAO), mas verificou-se que os metabólitos da FZ são os responsáveis pela inibição da MAO (ALI, 1999). A FZ possui metabolização intestinal, biotransformação

hepática e excreção renal (VROOMEN et al., 1990). Reimão et al. (2010), sugeriram que a atividade leishmanicida da FZ está relacionada alterações morfológicas e perda de organelas intracelulares com alvo em membrana nuclear e mitocôndria. Este medicamento demonstrou uma redução efetiva na concentração de parasitos quando administrada em camundongos, na dose de 50 mg/Kg, no tratamento da leishmaniose visceral (TEMPONE et al., 2010). Além de demonstrar atividade *in vitro* contra formas amastigotas de *Leishmania* spp. (NEAL et al., 1988) Este é um fármaco promissor também no tratamento da LTA, sendo o objetivo desta pesquisa, realizar um teste *in vivo* desta droga promovendo o tratamento clínico em cães portadores de LTA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, dividindo-se em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), sendo esta mundialmente mais disseminada (SINGH e SIVAKUMAR, 2004; BRASIL, 2010 e ALVAR et al., 2012). Em humanos é a segunda doença transmitida por protozoário mais importante no mundo, atrás unicamente da malária (DAVIDSON, 2005).

O desenvolvimento da forma clínica da doença está relacionado diretamente com o tipo de *Leishmania* envolvida, ou seja, espécies diferentes do agente desenvolvem a mesma manifestação clínica da Leishmaniose em diferentes áreas geográficas (Tabela 1).

Estudos apontam um aumento no número de casos notificados desta doença nas áreas acometidas, e sugerem relação com o aquecimento global (PISCOPO et al., 2006).

A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose que atinge os mamíferos silvestres (marsupiais, roedores, edentados, primatas, entre outros) e secundariamente animais domésticos. A transmissão pode ocorrer no ambiente silvestre, relacionada à exploração desordenada da floresta e derrubada das matas, por motivo ocupacional ou lazer, no ambiente rural e periurbano, está relacionada ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados, associada às matas secundárias ou residuais (BRASIL, 2010).

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida digenético (heteroxênico), desenvolvendo-se alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Fêmeas infectadas de *Phlebotomus* e *Lutzomyia spp.* são os vetores do parasito, responsáveis pela transmissão de todas as espécies de *Leishmania* (RANGEL et al., 1996; MATTHEW et al., 2004). Nos flebotomíneos, a *Leishmania* vive no meio extracelular, na luz do trato digestivo. As formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas

flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas e posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada (KILLICK-KENDRICK, 1990).

No hospedeiro vertebrado, o seu desenvolvimento depende dos macrófagos para replicação e sobrevivência tornando a *Leishmania* um parasito intracelular obrigatório (CUMMINGS et al., 2012).

Tabela 1. Relação entre diferentes espécies de *Leishmania* e sua forma clínica em diferentes áreas geográficas.

Forma da doença	Espécies nas Américas	Espécies nos outros países
LV	<i>L. chagasi</i> ; <i>L. amazonensis</i> .	<i>L. donovani</i> (India, Kenya); <i>L. infantum</i> (sul da Europa e Norte da Africa); <i>L. tropica</i> .
LT	<i>L. mexicana</i> ; <i>L. amazonensis</i> ; <i>L. (V) braziliensis</i> ; <i>L. (V) panamensis</i> ; <i>L. (V) guyanensis</i> ; <i>L. (V) peruviana</i> , <i>Leishmania (V.) naiffi</i> , <i>Leishmania (V) lainsoni</i> e <i>Leishmania (V) shawi</i> .	<i>L. tropica</i> ; <i>L. major</i> ; <i>L. aethiopica</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>L. donovani</i> .

Fonte: Tabela adaptada e baseada em revisão feita por Herwaldt, (1999).

2.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.

A LT é uma doença de distribuição mundial, nas Américas, onde a doença se denomina Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), há relatos de casos da doença do extremo sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção de Chile e Uruguai (BRASIL, 2010).

No Brasil, a LTA encontra-se presente com casos autóctones em todas as regiões (MADEIRA et al., 2003). As espécies mais importantes relacionadas à LTA no Brasil são a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (NAIFF et al., 1999). Outras espécies relacionadas com a doença na

América Latina, são *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) lainsoni* e *Leishmania (V.) shawi* (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

2.3 OCORRÊNCIA DOS VETORES DA LEISHMANIOSE TEGUMANTAR AMERICANA NO ESPÍRITO SANTO

No Espírito Santo, a *Lutzomyia intermedia* é a espécie antropofílica predominante na maioria das áreas endêmicas de LTA, outras espécies como a *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia migonei* e a *Lutzomyia fischeri* estão presentes nessas áreas exercendo o repasto sanguíneo em humanos e os cães (SESSA et al., 1994). A *Lutzomyia intermedia* é encontrada em áreas endêmicas dos municípios de Afonso Cláudio (FERREIRA et al., 2001), Vila Valério, Sooretama (VIRGENS et al., 2008), Viana (FALQUETO et al., 1986), Santa Leopoldina (SESSA et al., 1994) e Itarana (FALQUETO et al., 1991).

2.4 LEISHMANIOSE TEGUMANTAR AMERICANA - DOENÇA CLÍNICA

A evolução da infecção ocorre após a regurgitação do parasito pelo flebótomo vetor, o período de incubação médio é de dois a três meses, porém variações de tempo mais amplas podem ocorrer. A incubação pode durar de duas semanas até dois anos antes do aparecimento das lesões (BRASIL, 2010). A doença clínica se apresenta em uma pápula eritematosa, que evolui para um nódulo, em uma porcentagem dos casos, pode ocorrer adenopatia regional com presença ou ausência de linfagite. As lesões podem adquirir um carácter pleomórfico acentuado, apresentam-se ulceradas com bordas elevadas com presença de tecido de granulação ao fundo. Estas que podem involuir acarretando na auto cura ou progredir para lesões em mucosas, devido à disseminação hematogena e/ou linfática do parasito (MACHADO PINTO, 1994).

A LTA nos animais pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes ao quadro da enfermidade em humanos, e o parasitismo

ocorre preferencialmente em mucosas das vias aerodigestivas superiores, eventualmente pode ser observado lesões em bolsa escrotal (BRASIL, 2010).

2.5 LTA - AUTO CURA

Em casos de LTA, no velho mundo, episódios de auto cura são mais frequentes porém, este processo pode demorar de meses a anos. Na LTA, a auto cura ocorre com menos incidência (CHOI e LERNER, 2001). A auto cura está relacionada diretamente com a resposta apresentada pelas células T (MURRAY et al., 2004). Em estudo feito por Louzir et al. (1998), demonstraram que a ação imunomoduladora da interleucina – 10 (IL-10) sobre interferon – gama (IFN- γ), acarretou na cura espontânea das lesões.

2.6 PERSISTÊNCIA DO MICRORGANISMO

De acordo com Oliveira-Neto et al. (1998) a causa de recidiva, provavelmente ocorre pela persistência do parasito no local da lesão. A persistência do parasito foi observada após a cura clínica das lesões em humanos (SCHUBACH et al., 1998), e a recidiva ocorre após uma reativação destes microrganismos (CANNAVÒ et al., 2000). Em estudo feito por Mendonça et al. (2004) demonstraram uma alta presença do DNA de *Leishmania* nas lesões curadas, foi observada presença de formas amastigotas no foco inflamatório em algumas amostras, nesse estudo, em torno de 10 % dos casos foi possível isolar o parasito em cultura, as formas amastigotas de *Leishmania* foram posteriormente inoculadas em hamsters onde observou-se desenvolvimento das lesões características da doença, o que demonstra a persistência e viabilidade do parasito mesmo após a regressão da lesão.

2.7 IMUNOLOGIA

Os neutrófilos possuem funções no início da infecção, são as células responsáveis pela primeira atividade fagocitária de parasitos do gênero *Leishmania*, dando início a secreção da citocina interleucina – 8 (IL-8), com função de aumentar a migração de neutrófilos para o sítio de infecção, de interagir com macrófagos e estimular a produção de interferon-gama (IFN- γ). Após apoptose ocorre liberação de diversas citocinas, promovendo a ativação das células T (AWASTHI et al., 2004). Outro tipo celular que contribui com a ativação das células T são as células dendríticas, estimulando a produção de citocinas como a interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12) e IFN- γ (QI et al., 2003).

A resposta imune associada à célula T é o principal mecanismo de defesa associado à leishmaniose (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). Em destaque nessa doença temos as subpopulações de linfócitos T helper 1 (Th1), que produz interferon-gama (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2), com a função de ativar outros linfócitos e macrófagos e a de linfócitos, T helper 2 (Th2), produzindo as citocinas anti-inflamatórias interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10), além de ativar linfócitos B aumentando a produção de anticorpos (GOLDSBY et al., 2000).

Na leishmaniose tegumentar, a resposta imunológica equilibrada no balanço da produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10 tem prognóstico favorável para recuperação da lesão, entretanto níveis elevados de IFN- γ e baixos de IL-10 resultam em quadros crônicos e exacerbação da lesão (GOMES-SILVA et al., 2007).

Pacientes que apresentam a forma recidivante da doença possuem uma alta concentração de IFN- γ e uma baixa concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 (TUON et al., 2008).

2.8 DIAGNÓSTICO DA LTA

2.8.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da LTA, se baseia na característica da lesão, porém nem sempre estas adquirem formato uniforme e característico, o que pode dificultar o diagnóstico. As lesões devem ser associadas frequentemente aos dados epidemiológicos. Outro aspecto a ser considerado é que a evolução clínica da doença que está diretamente relacionada com a espécie de *Leishmania* envolvida e a resposta imune do hospedeiro (SARAVIA et al., 1989).

Doenças ulcerativas como piodermites e neoplasias devem ser abordadas no diagnóstico diferencial da LTA canina, outra doença de relevante importância são as micoses, em especial a esporotricose, que possui aspecto clínico semelhante ao da LTA. (BRASIL, 2010).

2.8.2 Diagnóstico laboratorial

2.8.2.1 Pesquisa direta

A pesquisa direta é um método prático e simples para o diagnóstico da leishmaniose. O princípio da técnica consiste, na análise microscópica do aspirado ou esfregaços do material proveniente das lesões características da doença (ESCOBAR et al., 1992). Esta técnica possui algumas restrições, relacionadas com o curso da infecção, ou seja, a probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, e infecções secundárias diminuem a sensibilidade do método. Outro fator importante é a espécie de *Leishmania* a ser pesquisada, pois em lesões provocadas por *L. (L.) amazonensis* encontra-se uma quantidade maior de parasitos, já em infecções provocadas por

espécies do subgênero *Viannia*, há escassez de formas amastigotas (BRASIL, 2010).

A histopatologia também pode ser uma ferramenta no diagnóstico da LTA, isto porque, frequentemente as lesões possuem baixa carga parasitária, e achados histopatológicos, como concentração de macrófagos, granuloma tuberculóide e degeneração de matriz extracelular são compatíveis com casos positivos para LTA (QUINTELLA et al., 2012).

2.8.2.2 Cultura de *Leishmania*

A cultura possui função diagnóstica principalmente relacionada com o isolamento do parasito e identificação da espécie envolvida, a forma promastigota pode ser observada após cinco dias da inoculação. Caso não haja o crescimento neste período, esta deve ser conservada durante trinta dias para liberação do resultado negativo. O material coletado para a realização deste exame pode ser o fragmento da borda da lesão, ou de uma maneira alternativa por punção da lesão, utilizando tubo a vácuo (BRASIL, 2010).

2.8.2.3 Metodologias para identificação da resposta imune humoral anti *Leishmania* como estratégia diagnóstica

2.8.2.3.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Em âmbito mundial, vários métodos de diagnóstico têm sido testados para detecção da leishmaniose. No Brasil preconiza-se o ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), (BRASIL, 2007).

A RIFI é uma técnica amplamente utilizada nos inquéritos epidemiológicos da LV em caninos. Estudos recentes alertaram para a baixa especificidade desta

técnica, apontando o problema da utilização exclusiva de técnicas sorológicas para o diagnóstico da leishmaniose. Exemplo disto foi demonstrado em um programa de controle da LV, que eutanasiou 155 animais com titulação acima de 1:40, no município do Rio de Janeiro dos animais avaliados neste estudo, foram isolados formas de *L. chagasi* em apenas 14 por cultivo de amostras, além de ter sido observados isolamento de outros protozoários como *L. braziliensis*, *Trypanosoma caninum*, indicando a presença de reação cruzada (SILVA et al., 2011). Em pesquisa epidemiológica no município de Divinópolis, verificou-se que a associação das técnicas sorológicas (RIFI e ELISA) e reação em cadeia da polimerase (PCR), proporcionou uma avaliação mais criteriosa para os animais pesquisados. A RIFI e a ELISA são técnicas também utilizadas em inquéritos epidemiológicos da LTA, Barbosa et al. (1999) realizaram em seu estudo o diagnóstico da LTA utilizando ambas as técnicas em humanos e caninos no município de Paraty, estado do Rio de Janeiro, obtendo 3.2% de positividade na RIFI e 10,2% na técnica de ELISA.

2.8.2.3.2 *Immunoblotting* ou *Western Blot* (WB)

O *immunoblotting* ou *Western Blot* é um ensaio imunoenzimático que identifica a reatividade específica dos anticorpos para vários antígenos de *Leishmania*, é um teste mais sensível quando comparado ao ELISA e RIFI (SINGH e SIVAKUMAR, 2011). Em estudo feito por Brito et al. (2000), utilizando o *Western Blot* para detecção de antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, também observou sensibilidade e especificidade superiores ao ELISA e RIFI.

Este teste demonstrou outras funções como na diferenciação de doenças que fazem reação cruzada com a LTA, como doença de chagas, paracoccidiodomicose e toxoplasmose (SZARGIKI et al., 2009).

Em pesquisa feita por Zanini et al. (2010), ressaltaram a utilidade do WB para identificação de cães portadores assintomáticos para LTA, e frisa sua utilidade na confirmação de outras técnicas imunossorológicas. A utilização do WB para o diagnóstico de pacientes assintomáticos também foi relatada por Curti et al. (2011) em estudo clínico e epidemiológico da LTA em humanos no sul do Brasil.

2.8.2.3.3 Citometria de fluxo

Estudos apontam a aplicabilidade da citometria de fluxo para detecção de anticorpos anti *Leishmania*, Rocha et al. (2002), padronizaram a citometria de fluxo para o diagnóstico da LTA em humanos, e aborda sua aplicação na detecção de pacientes com sintomatologia clínica.

Outra aplicação da citometria de fluxo é no monitoramento de populações celulares, em experimentos de estimulação antigênica vacinal para Leishmaniose, em estudo feito por Giunchetti et al. (2007) utilizando vacina com proteína proveniente de formas amastigotas de *L. braziliensis* associada com saponina como adjuvante, observaram a resposta imune de cães vacinados e utilizou esta técnica para diferenciação de populações de linfócitos e monócitos.

A citometria de fluxo também foi empregada no diagnóstico da LV em cães, Neta et al. (2006), que demonstraram seu desempenho perante a RIFI. O resultado obtido foi 96% na detecção de anticorpos em dos animais sorologicamente positivos na RIFI. Para o diagnóstico da LTA, a citometria de fluxo, se mostrou como uma ferramenta para o diagnóstico, principalmente em casos de risco de reação cruzada, como em estudo feito por Pissinate et al. (2008), que utilizaram esta técnica para detecção de anticorpos para *L. (L.) amazonensis* e frisou sobre os benefícios da citometria de fluxo no diagnóstico da LTA, principalmente em áreas onde a tripanossomíase também é endêmica.

2.8.2.4 Identificação de ácidos nucleicos

A PCR é um método prático e eficaz, para o diagnóstico das leishmanioses. A utilização desta técnica, se destaca principalmente pelos índices de especificidade e sensibilidade, como é demonstrado em um estudo feito em humanos por Srivastava et al. (2011) para o diagnóstico da LV, que mostrou resultados expressivos quanto a especificidade, atingindo percentuais em torno de 94,6% e sensibilidade em torno de 87,8%. Em amostras de fluido oral obtida de humanos por Galaï et al. (2011), foi detectado presença do DNA de *Leishmania*, com especificidade de 90% e sensibilidade de 94,6%. Lachaud et al. (2002) mostraram em um estudo, com pares

de *primer* alvo o cinetoplasto (DNA mitocondrial), 100% de positividade em amostras de sangue total de cães soropositivos para LV. Martinez et al. (2012) indica a PCR como importante ferramenta no auxílio ao diagnóstico da leishmaniose, principalmente em casos inconclusivos de exames imunológicos.

A utilização da PCR, em técnicas não invasivas para diagnóstico da LTA, foi utilizada por Valencia et al. (2012) no Peru, para detecção da doença em humanos, no experimento foi utilizado papel filtro para coleta do material nas lesões suspeitas. A PCR também foi utilizada para detecção e identificação de diversas espécies causadoras da LTA (BERZUZA-CRUZ et al., 2009)

2.8.2.5 Outras técnicas para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana

O método de reação de hipersensibilidade tardia ou intradermorreação é frequentemente utilizado para o diagnóstico da LTA em humanos, no entanto esta técnica apresentou-se limitada, em experimento realizado por Santos et al. (2005), que utilizaram a mesma concentração de antígeno padronizados (Imunoleish®) para realização do exame em cães, obtendo apenas 10% de positividade nos testes. Hermeto et al. (1994), com o mesmo antígeno, obtiveram porcentagem de resultados positivos de 30,7%. Já outros trabalhos utilizando concentrações maiores de antígenos apresentaram 100% de positividade (GENARO et al., 1992).

A necessidade de novas técnicas para diagnóstico da LTA, incentiva os pesquisadores na busca constante de novas metodologias, como a utilização de biomarcadores, onde os testes são feitos em associação da imunologia com outras tecnologias (impedância eletromagnética). Esta associação tem sido uma alternativa de diagnóstico desta doença, sendo um método não específico podendo ser utilizado para detecção de outras doenças transmitidas por protozoários (PERINOTO et al., 2010).

2.9 TRATAMENTO PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

2.9.1 Antimoniais pentavalentes

A atividade leishmanicida dos antimoniais pentavalentes, consiste na ação inibitória enzimática, alterando o metabolismo parasitário (BAIOCO et al., 2009).

As terapias contra a leishmaniose são constantemente pesquisadas. As drogas de primeira linha utilizadas em humanos são os antimoniais pentavalentes, e as de segunda linha incluem a anfotericina B e a pentamidina, medicamentos considerados leishmanicidas. A alta toxicidade destes anti-leishmaniais são obstáculos no tratamento da doença, podendo em alguns casos ocasionar sua interrupção (OLIVEIRA et al., 2011). Em estudo feito por Tuon et al. (2008) relata o antimonial pentavalente, como a droga mais utilizada no tratamento da leishmaniose tegumentar. O estibogluconato de sódio é um tipo de antimonial utilizado no tratamento da LTA. Solomon et al. (2012), utilizaram este medicamento em pacientes com LTA, e obteve 70% de eficácia porém a recidiva foi observada em 29% dos casos em humanos.

Outro antimonial utilizado no tratamento da LTA em humanos é o antimoniato de meglumina e n-metilglucamina, esta droga foi estudada por Netto et al. (1990), nesse experimento observaram recidiva em torno de 10% dos casos de LTA.

Pela legislação sanitária brasileira as drogas acima citadas, assim como a anfotericina B, são de uso exclusivo para o tratamento em humanos, não sendo permitido seu uso no tratamento de animais (BRASIL, 2006).

2.9.2 Antifúngicos

Antifúngicos como fluconazol, itraconazol, imidazol e cetoconazol tem sido utilizados no tratamento da LTA em humanos, apresentando variação no sucesso do tratamento. Este grupo de medicamentos tem ação de inibir o ergosterol (BERMAN, 1997).

O uso do fluconazol, em pacientes humanos com LTA resultou em 89% de cura (SOUSA et al., 2011).

A anfotericina B é um medicamento utilizado com eficácia em tratamentos de humanos (BOMB et al., 2011). De acordo com Berman et al. (1986), este princípio ativo, se liga aos esteroides (ergosterol) presentes na membrana celular dos protozoários, acarretando um aumento da permeabilidade e ruptura da célula.

A anfotericina B lipossomal também demonstrou atividade no tratamento da LTA, Solomon et al. (2012), que observaram cura de 85% dos pacientes, observando recidiva em 3% dos pacientes tratados.

2.9.3 Outras drogas

Em revisão de literatura feita por Tuon et al. (2008) relataram outras drogas utilizadas no tratamento da Leishmaniose tegumentar, como pentamidina, imiquimode, paromomicina e aluporinol. O aluporinol é uma molécula que possui atividade quando se hidrolisa em aluporinol nucleosídeo (análogo da adenina) e incorporado ao RNA da *Leishmania*, inibindo seu crescimento (BERENS et al., 1980).

Outro medicamento que possui atividade anti-*Leishmania* constantemente pesquisada é a miltefosina. Diversos estudos demonstram a eficácia desta droga no tratamento da LTA, como observado em estudo desenvolvido em humanos na Bolívia por Soto et al. (2008), utilizando este medicamento no tratamento da leishmaniose tegumentar, obtiveram sucesso de 88% no tratamento das lesões cutâneas, diversos outros autores utilizaram esta droga, para o mesmo fim como Vélez et al. (2010), obtendo percentual de cura de 69,8%. Já Van Thiel et al. (2010), obtiveram 88,2%, Machado et al. (2010) com 75% e Chrusciak-Talhari et al. (2011)

com 71,4% de cura clínica. A miltefosina é uma droga com ação no metabolismo das proteínas, pois possui atividade inibitória na proteína quinase B (Ruiter et al., 2003).

2.9.4 Terapias tópicas

A utilização de terapias tópicas, no tratamento da LTA em cães, tem se mostrado uma alternativa prática e eficaz no controle de lesões, como por exemplo, a utilização de radio frequência induzindo calor para remissão das lesões cutâneas, é uma técnica já testada, que demonstrou eficiência no tratamento de humanos. A utilização no tratamento de cães, recentemente foi empregada experimentalmente como em estudo feito por Ahuja et al. (2012) onde foram testados dois cães com LTA, foi observado regressão completa da lesão em 45 dias, sem recidiva durante 16 meses.

A utilização de terapias medicamentosas tópicas, também vem sendo trabalhadas em experimentos como o de Ben Salah et al. (2009) onde utilizaram, uma formulação de paramomicina e gentamicina em base hidrofílica obtendo 94% de cura no grupo tratado, não observando recidiva nos 180 dias pós tratamento. Em outro estudo feito por Alavi-Naini, (2008), foram administradas topicamente, baixas doses de morfina, que demonstrou um efeito imunomodulador induzindo a cura da lesão cutânea da doença.

2.9.5 A furazolidona (FZ)

A furazolidona é utilizada no tratamento humano, em doenças bacterianas e protozoárias, principalmente em enterites provocadas por estes agentes. Sua aplicabilidade no tratamento animal foi muito observada em um passado recente, onde ganhou importância na produção animal, porém devido a sua ação residual sua utilização foi proibida (ALI, 1999).

Estudos sobre a FZ, abordam principalmente sua genotoxicidade e carcinogenicidade, apontam sua ação residual, principalmente em alguns órgãos alvo como tecido muscular e fígado (ALI, 1999). Ali, (1999) ressalta também a ação

metabólica do tratamento utilizando a FZ, sendo observadas alterações no lipidograma diretamente relacionado com o aumento da dose administrada.

Experimento desenvolvido por Tempone et al. (2010), demonstrou a ação leishmanicida desta droga. Neste estudo, foi realizada a administração intraperitoneal da FZ lipossomal, em hamsters infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. O trabalho de Tempone et. al (2010).

CAPÍTULO 1

3 .CAP.1 - TÍTULO

USO DA FURAZOLIDONA NO TRATAMENTO CLÍNICO DE CÃES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Artigo submetido ao periódico Veterinary Parasitology sob nº VETPAR-D-13-7400

3.1 RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença difundida em diversos países, e os derivados antimoniais pentavalentes, são as drogas de escolha no tratamento desta enfermidade para humanos. Porém, como recomendado pelo Ministério da Saúde, é contra indicado para o tratamento em animais. O objetivo deste trabalho foi testar o uso da furazolidona (FZ), no tratamento de lesões em cães portadores de LTA. O estudo foi feito com nove cães com lesões, e a doença foi confirmada por técnicas de ELISA, biópsia para PCR e cultura para *Leishmania (V.) braziliensis*. O medicamento foi administrado via oral, na dosagem de 20 mg/Kg a cada doze horas durante 7 dias, em três etapas com intervalo de 10 dias, sendo realizados exames laboratoriais para monitoramento dos padrões hematológicos e bioquímicos. A remissão da lesão foi observada em sete dos nove animais submetidos ao tratamento. A FZ demonstrou efeito terapêutico quando administrado no tratamento das lesões dos cães com LTA.

Palavras chave: *Leishmania (V.) braziliensis*, terapia medicamentosa, cão - doenças nitrofuranos.

3.2 ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a widespread disease in several countries. As recommended by the Brazilian ministry for health, a treatment of animals is contraindicated. The aim of this study was to test the use of furazolidone (FZ) to treat lesions in dogs suffering from ACL. The study was conducted with nine dogs with lesions and the presence of ACL as confirmed by ELISA and PCR for biopsy and culture for *Leishmania (V.) braziliensis*. The drug was administered orally in a concentration of 20 mg / kg every twelve hours for seven days, in three steps with an interval of 10 days, accompanied by laboratory monitoring of hematological and biochemical patterns. A regression of the lesion was observed in 7 animals. FZ has proven an effective drug in the remission of lesions in dogs with ACL injury. Keywords: *Leishmania (V.) braziliensis*, drug therapy, dog – diseases, nitrofurans.

3.3 INTRODUÇÃO

A leishmaniose esta presente em 98 países, sendo a prevalência aproximada de 12 milhões de casos humanos, com média de 60 mil mortes por ano. É causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, e transmitida por fêmeas de *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* spp no novo mundo, dividindo-se em leishmaniose visceral (LV), e outra forma que pode acometer a pele ou mucosa denominada leishmaniose tegumentar (LT), sendo esta mundialmente mais frequente, e adquire a denominação nas américas de Leishmaniose tegumentar americana (MATTHEW *et al.* 2004; SINGH e SIVAKUMAR, 2004; BRASIL, 2010).

O tratamento para a leishmaniose tegumentar americana (LTA) possui diversos aspectos para ainda serem pesquisados, principalmente relacionados à toxicidade das drogas utilizadas, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos, a recidiva e a resistência dos microrganismos (LIMA *et al.*, 2007).

Os antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses em humanos, representados pelo antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil (BRASIL, 2010, MAYRINK *et al.*, 2006). O tratamento de cães com esses medicamentos não é permitido no Brasil, principalmente devido a uma possível formação de resistência do parasito ao medicamento (BRASIL, 2010).

Os constantes desafios na busca de novos medicamentos para a leishmaniose resultaram em descobertas, como a furazolidona N-(5-nitro-2-furfuri1ideno)-3-amino-2-oxazolidona, um derivado nitrofurano com ação antibacteriana e antiprotozoária onde atua sobre organelas intracelulares, sendo que os metabólitos da FZ são os responsáveis pela inibição da MAO (ALI, 1999). A FZ possui metabolização intestinal, biotransformação hepática e excreção renal (Vroomen *et al.*, 1990). Reimão *et al.* (2010), sugeriram que a atividade leishmanicida da FZ está relacionada alterações morfológicas e perda de organelas intracelulares com alvo em membrana nuclear e mitocôndria. Este medicamento demonstrou uma redução efetiva na concentração de parasitos, quando administrada em camundongos, na dose de 50 mg/Kg, no tratamento da leishmaniose visceral (TEMPONE *et al.*, 2010). Este é um medicamento promissor

também no tratamento da LTA, demonstrando atividade *in vitro* contra formas amastigotas de *Leishmania* spp. (NEAL et al., 1988). O objetivo da pesquisa foi utilizar a FZ em cães portadores sintomáticos da LTA, observar a remissão das lesões no tratamento clínico dos animais.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Seleção dos animais

O experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFES) sob número de protocolo 013/2012. Foram selecionados nove animais com lesões indicativas de LTA, sendo que seis apresentavam a lesão com tamanho médio de 164,16 mm² no tecido superficial da epiderme do pavilhão auricular e três apresentavam lesão em mucosa nasal com tamanho médio de 190,16 mm². Como critério de inclusão esses animais foram submetidos a exames imunológicos de ELISA e *Western blot* PCR e cultura para confirmação do diagnóstico. Todos os animais eram sem raça definida (SRD), sendo três machos e seis fêmeas, adultos e residentes no município de Guarapari - ES.

3.4.2 Diagnóstico

Para diagnóstico laboratorial inicial para LTA foram coletadas dos animais amostras de sangue venoso para realização da técnica de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) (RIBEIRO et al., 2007) e *Western Blot* (WB) (ZANINI et al., 2010).

Para a realização das biópsias, os animais receberam drogas dissociativas (10% de cetamina 15 mg/kg/IM e 20% de xilazina 2 mg/kg/IM) e foram anestesiados localmente na região em que o procedimento foi realizado, sendo utilizada lidocaína 0,2 % (diluída 1:10).

Após a sedação, amostras de tecido da borda das lesões foram coletadas e encaminhadas, para PCR e cultivo dos protozoários e para extração de DNA das amostras de tecido, utilizou-se protocolo de Barrero et al. (2008). Para a PCR, as reações foram realizadas com volume final de 25µl e foram utilizados os iniciadores B1 e B2 (DE BRUIJN e BARKER, 1992) que amplificam uma sequência de 750 pares de bases do DNA de *Leishmania (Viannia)*. Para o cultivo foi utilizado o meio NNN – Novy, MacNeal, e Nicolle (Ágar sangue modificado) e LIT (Liver Infusion Tryptose) de *Leishmania spp* (ROCHA et al., 2002) modificado. As culturas foram mantidas em estufa incubadora refrigerada com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) (modelo 347), temperatura de 24±1°C durante 30 dias. Todos os animais do experimento foram positivos sorologicamente, apresentaram reação positiva na PCR e houve crescimento do microrganismo em cultura.

3.4.3 Tratamento

3.4.3.1 Teste piloto para ajuste de dose

Seis cães saudáveis foram utilizados em um teste piloto, para determinação da dose via oral da furazolidona a ser utilizada, uma vez que a dose referência em camundongos foi 50 mg/kg de furazolidona aplicadas intraperitonealmente (Tempone et al., 2010). Utilizando a dose referência via oral nos seis cães, foram observados efeitos colaterais a partir do quarto dia de administração, como perda de apetite e sinais neurológicos (incoordenação motora), incompatíveis com a continuidade do tratamento na concentração de 50 mg/kg/dia de furazolidona, optando-se então por tratar com a dose de 20 mg/kg de furazolidona, a cada doze horas (BID).

3.4.3.2 Grupo controle

Os mesmos animais submetidos ao experimento, foram utilizados no grupo controle, para isso estes foram vermifugados e mantidos durante um período de quarenta dias sob dieta padronizada, com o intuito de observar o comportamento evolutivo da doença neste período. O ponto de observação foi a presença de auto cura, com remissão espontânea da lesão. Este achado não foi observado durante este período em todo o grupo em estudo.

3.4.3.3 Uso da FZ em cães enfermos

No grupo de nove animais com as lesões acima descritas, a administração do medicamento foi realizada em três períodos de sete dias com intervalos de 10 dias sem tratamento, totalizando 41 dias de tratamento. Foi administrada furazolidona (Giarlam® comprimido) em uma concentração de 20 mg/kg BID por via oral, durante um período de sete dias. No início de cada novo ciclo de tratamento, os animais foram submetidos a uma nova pesagem para ajuste de dose do medicamento.

3.4.4 Avaliação laboratorial

Os animais foram avaliados por exames laboratoriais, foi feito monitoramento pré-tratamento, um dia antes do início do tratamento e após os períodos de tratamento, com exames de perfil hematológico, hepático e renal, visto a natureza de biotransformação e excreção do princípio ativo.

As amostras foram coletadas por venopunção periférica, com agulha 40x12 e seringa de 10 ml, com acesso a veia jugular, as amostras foram armazenadas em tubos estéreis, com capacidade para 4 ml, contendo fatores de ativação de coagulo para destinação às análises bioquímicas e em tubos estéreis com capacidade de 2 ml contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetracético), para a realização das análises hematológicas. As amostras de urina foram coletadas, com o auxílio de uma sonda uretral e armazenadas em tubos cônicos tipo falcon, estéreis com capacidade para 15 ml.

Todas as amostras foram acondicionadas e refrigeradas em recipiente com isolamento térmico, contendo gelo reciclável e destinadas para análise ao Centro de Diagnóstico Veterinário (CDV), localizado no município de Vitoria ES.

Nos ensaios bioquímicos, foi feita a mensuração da atividade sérica de enzimas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (γ GT), dosou-se proteína total e frações (albumina e globulina), proteína plasmática total (PPT), colesterol, triglicerídeos, glicose, uréia, creatinina, sódio, potássio, fósforo e cálcio. As amostras foram processadas em bioquímica automática (ChemWell-t[®], Awareness Technology, Inc. Palm City, FL – USA), utilizando reagente (Labtest[®]).

Exames hematológicos completos, também foram realizados para o monitoramento, analisando o eritrograma, com a contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, calculo de hematócrito, mensuração do volume corpuscular médio (VCM), cálculos para determinar a hemoglobina corpuscular média (CHCM) e leucograma com contagem de leucócitos totais. A hematologia foi feita com o auxílio de um contador hematológico (Counter T 890 – Backman Counter Inc. USA). A diferenciação dos leucócitos e observação de alterações hematológicas foi feita manualmente por microscopia óptica.

A urinálise também foi realizada, com avaliação física da cor, odor, aspecto e densidade urinária. A análise química da urina foi realizada por bioquímica seca Uriquest[®] (Labtest[®]), com mensuração de bilirrubina, urobilinogênio, corpos cetônicos, proteína e PH e a avaliação dos elementos anormais de sedimentoscopia (EAS), com a observação de células epiteliais de descamação, leucócitos, cilindrúria e cristalúria por microscopia óptica. Além da análise normal da urina foi empregado também a enzimologia, com análise da γ GT urinária. As amostras foram processadas em bioquímica automática (ChemWell-t[®]-Awareness Technology, Inc. Palm City, FL – USA), utilizando reagente (Labtest[®]). Foi determinado ainda a relação proteína/creatinina urinária como teste de função renal.

3.4.5 Medição das lesões

A medição das áreas de lesão foi feita com o auxílio de um paquímetro, mensuradas em milímetros quadrados, em três períodos, no momento inicial, vigésimo e quadragésimo primeiro dia.

3.4.6 Análise estatística

O cálculo amostral foi realizado no site: http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/qua_2_medias (ARMITAGE et al., 1987). Foi realizado o teste de D'Agostino e Pearson para verificar a normalidade dos erros amostrais. Foi realizado o teste t pareado para comparação do diâmetro das lesões nos dias 20 e 41 com o início do tratamento. Foi utilizado o nível de 5% de probabilidade de erro para todos os testes estatísticos realizados.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Achados laboratoriais

3.5.1.1 Hematologia

Entre os nove animais avaliados, antes do início do experimento, dois animais apresentaram contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito abaixo do valor de referência, quatro apresentaram trombocitopenia e três apresentaram eosinofilia. Ao longo do tratamento, um animal aumentou o número de eritrócitos chegando ao valor de referência, porém três animais diminuíram a quantidade de plaquetas, um animal desenvolveu leucopenia acompanhado de neutropenia, dois desenvolveram linfopenia e dois normalizaram a contagem de eosinófilos (Tabela 1).

Tabela 1: Dados hematológicos dos cães (n=9) com LTA nos momentos pré (M1) e pós (M2) tratamento com furazolidona.

Parâmetros	Mo-mento	Cães									Refe-rência*
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
He (x10 ⁶ /µl)	1	6,6	7,08	5,14	6,93	7,18	4,95	5,95	6,23	6,23	5,5-8,5
	2	5,94	6,32	6,28	7,1	6,92	4,61	6,41	6,47	7,24	
Hb. (g/dL)	1	14,1	16	9,6	16,3	15,4	10,6	13,1	14,9	14,8	12,0-
	2	12,1	14	11,5	16	13,8	9,6	13,3	14,1	16,2	18,0
Ht. (%)	1	40,7	46,9	27,3	47,4	44,6	30,8	37,6	41,5	42,6	37-55
	2	36,4	41,3	33,9	47,1	42,4	28,4	39,8	41,8	49	
VCM (fl)	1	61,7	66,2	53,1	68,4	62,1	62,2	63,2	66,6	68,4	60-77
	2	61,3	65,3	54	66,3	61,3	61,6	62,1	64,6	67,7	
CHCM (%)	1	34,6	34,1	35,2	34,4	34,5	34,4	34,8	35,9	34,7	32-36
	2	33,2	33,9	33,9	34	32,5	33,8	33,4	33,7	33,1	
Plaq. (/µl)	1	115000	116000	280000	249000	244000	126000	255000	237000	173000	175.000-
	2	99000	78000	280000	137000	136000	150000	192000	141000	133000	500.000
Leuc. (x10 ³ /µl)	1	9.600	8.500	7.600	10.800	11.300	7.700	9.800	13.400	6.800	6000-
	2	4.900	8.500	7.600	8.200	10.500	7.400	6.400	13.900	7.800	17000
Bast. (/µl)	1	0	0	0	0	0	77	196	0	0	0-300
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Seg. (/µl)	1	4320	4420	4864	6588	6554	4620	7252	7102	4012	3000-
	2	2303	5104	5508	4592	6720	4810	3840	8896	5148	11500
Linf. (/µl)	1	3456	2974	1140	2052	1808	1463	1666	3618	1360	1000-
	2	1862	2200	891	1722	1890	1480	832	1807	1326	4800
Eos. (/µl)	1	576	340	532	1620	1695	308	196	2144	408	100-
	2	147	616	567	656	315	74	640	1946	390	1250
Bas. (/µl)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	RAROS
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mon. (/µl)	1	1248	765	1064	540	1243	1232	490	536	1020	150-
	2	605	880	1134	1230	1575	1036	1024	1251	936	1350
PPT (g/dL)	1	8,8	7,8	8,2	8	7	10	8	7,2	7,8	6,0-8,0
	2	9,0	8,0	9,0	8,4	8,2	10,6	8,2	8,2	8,4	

Legenda: He: hemácias, Ht: hematócrito, VCM: volume corpuscular médio, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, Bast: bastonetes, Seg.: segmentados, Linf.: linfócitos, Eos.: eosinófilos, Bas.: basófilos, Mon.: monócitos e PPT.: Proteína plasmática total.

Fonte: (JAIN, 1993)

3.5.1.2 Bioquímica

Alguns achados bioquímicos foram observados na dinâmica do experimento, quanto à dosagem de albumina, um animal já apresentava nível de albumina abaixo do valor de referência antes do início do tratamento, porém seis animais diminuíram a quantidade de albumina ao longo do tratamento. Paralelamente houve aumento na globulina de todos os animais no experimento. Quanto a ALT, três animais já possuíam atividade sérica desta enzima elevada no pré-tratamento sendo que um normalizou. Com referência a AST, dois animais possuíam a atividade sérica desta enzima aumentada no pré-tratamento, sendo que um manteve a atividade elevada e um diminuiu, porém dois animais aumentaram a atividade desta enzima no final experimento. Não foram observados alterações de creatinina, nem de FA, porém três animais apresentaram aumento nesta enzima no início, normalizando no final do tratamento. A dosagem de glicose, colesterol e triglicerídeos, não sofreram alterações marcantes durante o tratamento (Tabela 2).

Tabela 2: Dados bioquímicos dos cães (n=9) com LTA nos momentos pré (M1) e pós (M2) tratamento com furazolidona.

Parâ- metros	Mo- mento	Cães									Refe- rência*
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Albumina	1	2,69	3,23	2,73	3,42	3,49	2,42	2,99	3,12	3,15	2,6-3,3
	2	2,28	2,52	2,08	2,61	2,78	2,42	2,54	2,33	2,64	
ALT (U/L)	1	77,1	41,1	27,5	87,1	47,8	50,6	71,4	42,1	39,3	15-58
	2	66	30,2	23,9	69,3	35,5	43,3	46,5	29,2	32,9	
AST (U/L)	1	65,4	38,9	39,4	68,9	75,8	58,7	64,9	48	46	23-66
	2	53,5	36,4	49,2	60,9	76,3	73,2	49,8	89,4	61,6	
Colest. (mg/dL)	1	122,9	121,1	113,2	135,3	182,1	120,2	103,5	117,6	100,8	135-270
	2	136,2	114,5	117,9	142,3	238,5	123,3	102,3	147,7	107	
Creat. (mg/dL)	1	0,46	0,71	0,85	0,84	1,04	1,33	0,82	1,0	0,85	0,5-1,5
	2	0,35	0,92	0,94	0,63	0,84	1,37	0,91	1,11	0,77	
F. alc. (U/L)	1	73,1	139,2	221,9	290,4	240,6	87,3	151,3	61,5	134,6	20-156
	2	66	41	66	107	132	49	99	74	149	
γGT (U/L)	1	11	4	8	10	5	9	6	4	5	1,2-6,4
	2	8	14	7	10	9	7	9	9	10	
Globul. (g/dL)	1	6,01	4,47	5,27	4,18	3,28	6,58	5,01	2,77	4,15	2,7-4,4
	2	6,62	5,18	6,42	5,59	5,02	7,38	4,96	5,47	5,26	
Glicose (mg/dL)	1	90,9	97,9	92,8	89,1	96,5	98,3	102,5	103,9	86,9	65-118
	2	99,7	98,8	103,9	95,6	97,4	91,2	105,8	95,6	101,6	
Prot. Tot. (g/dL)	1	8,7	7,7	8,0	7,6	6,77	9,0	8,0	5,9	7,3	5,4-7,1
	2	8,9	7,7	8,5	8,2	7,8	9,8	7,5	7,8	7,9	
Triglic. (mg/dL)	1	54	38	40	100	61	36	58	44	44	20-112
	2	32	24	37	32	51	17	26	42	28	
Uréia (mg/dL)	1	20,4	39,8	28,9	47,4	42,6	42,1	26,5	47,4	33,8	21,4- 59,9
	2	20,7	31,6	22,7	25,7	41,8	46,2	24	30	28,7	

Legenda: ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, γGT gama glutamil transferase, F. Alc.: fosfatase alcalina, Globul.: globulina, Protot. Tot.: Proteína total, Triglic.: Triglicerídeos.

Fontes: (MEYER e HARVEY, 1998; KANEKO, HARVEY e BRUSS, 1997).

3.5.1.3 Urinálise

Dos nove animais tratados, foi observado que apenas um apresentou a densidade da urina alterada no exame pré-tratamento, apresentando hipostenúria com densidade urinária de 1.006 g/mL, e aumento na relação proteína/creatinina quantificada na urina de 0,74 mg/mg. Ao final do tratamento este manteve uma discreta alteração na relação proteína/creatinina urinária com o valor de 0,58 mg/mg, um outro animal apresentou enzimúria elevada, onde foi observado aumento na γ GT urinária com concentração de 102,6 UI/L.

3.5.2 Lesões cutâneas

Ao longo do tratamento, foi observado e mensurado com o auxílio do paquímetro a regressão gradativa da lesão até sua remissão. Ao final do quadragésimo primeiro dia, entre os nove animais tratados, sete apresentaram remissão clínica total da lesão, um apresentou remissão parcial da lesão em pele e um apresentou regressão parcial da lesão em mucosa (Tabela 3).

Tabela 3. Medição da lesão ao longo do tratamento em mm².

Animal tratado FZ	Tamanho inicial (mm²)	20º dia (mm²)	41º dia (mm²)	Remissão completa
Animal 1mc*	320	304	304	Não
Animal 2ct**	200	66	0	Sim
Animal 3mc*	342	171	0	Sim
Animal 4ct**	252	120	0	Sim
Animal 5mc	100	36	0	Sim
Animal 6ct	270	448	342	Não
Animal 7ct	219	66	0	Sim
Animal 8ct	56	25	0	Sim
Animal 9ct	140	40	0	Sim

* mc animal com lesão mucocutânea, ** ct animal com lesão cutânea.

Os dados apresentaram distribuição normal mediante teste de D'Agostino e Pearson ($k^2=0.61$, $p=0.74$). Observou-se uma diferença estatisticamente não significativa ($t_{DF=8,\alpha=0,05}=1.94$, $p=0.0887$) do tamanho da lesão, entre o início e o 20º dia de tratamento e uma diferença significativa entre o início e o 41º dia de tratamento ($t_{DF=8,\alpha=0,05}=3.25$, $p=0.0117$) e entre o 20º dia e 41º dia de tratamento ($t_{DF=8,\alpha=0,05}=3.92$, $p=0.0044$), mediante o teste de t pareado (Figura 1).

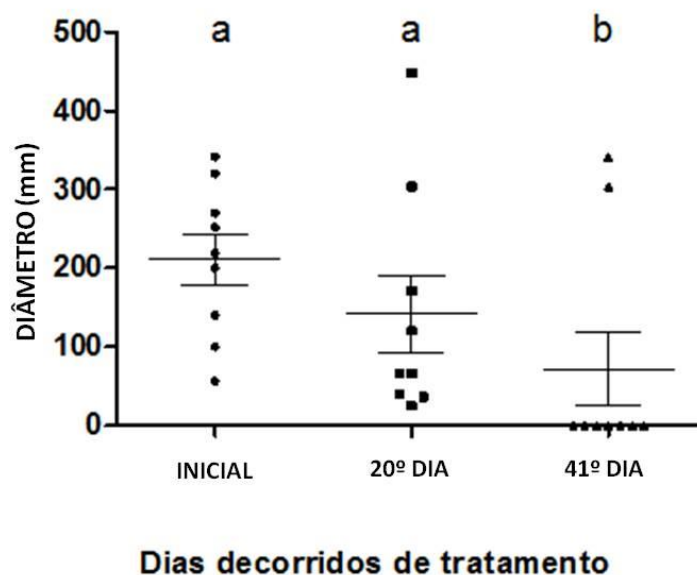


Figura 1. Gráfico comparativo de dispersão do diâmetro de lesões tegumentares, no momento inicial, vigésimo e quadragésimo primeiro dia de tratamento de cães com LTA tratados com FZ.

3.6 DISCUSSÃO

O protocolo de tratamento estipulado no presente trabalho, foi referenciado em esquema terapêutico realizado por Tempone et al. (2010), que utilizou 50 mg/Kg/dia de FZ, administrada intraperitonealmente em camundongos portadores de LV. Porém houve uma necessidade de adequação da dose para 20 mg/Kg BID em caninos, visto os efeitos colaterais quando houve a administração da dose adotada pelo referido trabalho.

Há princípio a atividade da FZ administrada em 20 mg/Kg BID no tratamento dos cães com LTA foi positiva, observando regressão das lesões em um percentual dos animais tratados, entretanto, Costa et al. (1985), não obteve resultados

satisfatórios no tratamento da leishmaniose cutânea em humanos com dose de 8 mg/Kg administrado via oral durante dez dias.

Os achados obtidos no presente trabalho eram esperados, pois em experimento *in vitro* feito por Reimão et al. (2010) demonstrou a atividade leishmanicida da FZ contra diversas espécies de *Leishmania*, inclusive a *L. (Viannia) braziliensis* e Tempone et al. (2010) que utilizou a FZ no tratamento de camundongos infectados por *L. chagasi*, observando o potencial leishmanicida desta droga.

Todos os animais do experimento foram submetidos a uma bateria de exames para diagnóstico da LTA, os testes empregados para este fim foram ELISA, *Western Blot*, cultivo e PCR, os animais apresentaram reação positiva em todos os testes imunológicos realizados, foram positivos na PCR e foi observado crescimento do microrganismo na cultura.

Neste estudo, achados hematológicos como anemia e trombocitopenia foram observados, antes e durante o tratamento, essas alterações também foram observadas em trabalho desenvolvido por Figueiredo et al. (2012), que relatou essas alterações nos cães com LTA, a anemia foi observada em 66% dos casos de animais portadores de LTA (DOS SANTOS et al., 2007). A diminuição no número de eritrócitos ocorreu em cães portadores de LV, de acordo com Trópia de Abreu et al. (2011), que abordou o mielograma para esclarecer as possíveis causas desta citopenia, neste estudo, foi observado aumento da relação mielóide eritróide M:E, onde os precursores mielóides encontravam-se em maior número que os precursores eritróides, fato este que se refletiu em anemia no hemograma.

Devido às características de biotransformação hepática e excreção renal do fármaco, o monitoramento desses órgãos foi de relevante importância para o trabalho, não houve alteração significativa na atividade sérica das enzimas hepáticas ALT e AST, os dos parâmetros de monitoramento renal ureia e creatinina. Nesse experimento houve a preocupação de quantificar marcadores precoces de lesão renal, como a γ GT (urinária) onde apenas um apresentou alteração desta enzima, porém esta alteração já tinha sido observada no pré-tratamento.

Um achado bioquímico relevante foi a diminuição da relação entre a albumina e globulina, encontrada nos cães portadores de LTA. Esta alteração foi observada por dos Santos et al. (2007) em estudo feito com cães portadores de desta doença. A diminuição da relação albumina/globulina é frequentemente relatada em artigos abordando animais portadores de LV, como observado por Reis et al. (2006) estudando a hematologia e bioquímica de animais com LV e por Giunchetti et al. (2008) em experimento abordando a histopatologia, imunohistoquímica hepática e alterações bioquímicas de animais com LV.

O índice de remissão das lesões foi significativa ($t_{DF=8, \alpha=0,05}=3.25$, $p=0,0117$), como pode ser observado na figura 1, aos 41 dias de tratamento, sendo que este tratamento com FZ resultou em regressão da lesão em 78% dos cães com LTA. Os resultados do presente trabalho foi superior ao tratamento utilizando antimoniato de meglumina 10-20 mg/kg durante 20 dias em humanos com sucesso de 53% (RODRIGUES et al., 2006) e o uso de miltefosina nas doses de 150 mg/dia durante 28 dias, que apresentou cura em 59% dos pacientes (VÉLEZ et al., 2010) assim como Machado et al. (2010) com 75% de sucesso tratando durante 28 dias na dose de 50 mg/dia (≤ 29 kg), 100 mg/dia (≤ 45 kg) e 150 mg/dia (> 45 kg). Vélez et al. (2012) obtiveram resultados superiores em tratamento utilizando antimoniato de meglumina na dose de 14-16 mg/kg por via intramuscular, durante um período que variou de 10 a 30 dias, neste trabalho foi observado a remissão das lesões em todos os animais, sem recidiva durante 180 dias.

3.7 REFERÊNCIAS

ARMITAGE, P.; BERRY, G. The planning of statistical investigations. In: **Statistical methods in medical research**. 2.ed. Oxford, Blackwell, p.179-185, 1987.

ALI, B. H. Pharmacological, Therapeutic and Toxicological Properties of Furazolidone: Some Recent Research. **An International Journal Publishing**

Topical Reviews and Research Articles on all Aspects of the Veterinary Sciences, Dordrecht, v. 23, n. 6, p. 343-360, 1999.

BARRERO, N.M.L. et al. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v. 35, n. 1, p. 65-74, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.

COSTA, J. M. L. et al. Furazolidone treatment of cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 2, p. 274-274, 1985.

DE BRUIJN, M. H. L.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v. 52, n. 1, p. 45-58, 1992.

DOS SANTOS, I. B. et al. Sporotrichosis—The main differential diagnosis with tegumentary leishmaniasis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 1-6, 2007.

FIGUEREDO, L. A. et al. Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*-infected dogs from Pernambuco, Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 21, n. 4, p. 418, 2012.

GIUNCHETTI et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 269-277, 2008.

KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. New York. Academic Press, 932p. 1997.

LIMA, E. B. D. et al. Treatment of american cutaneous leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, p. 111-124, 2007.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial (Miltefosine for *L. braziliensis* CL). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, USA, v. 4, n. 12, p. e912, 2010.

MATTHEW, E. R. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463, 2004.

MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 14-21, 2006.

MEYER, D. J., HARCEY, J. W. **Veterinary Laboratory Medicine** Philadelphia, W. B. Saunders, 2. ed, 373p., 1998.

NEAL, R. A.; VANBUEREN, J.; HOOPER, G. The activity of nitrofurazone and furazolidone against *leishmania-donovani*, *l-major* and *leishmania-enriettii* in vitro and in vivo. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 82, n. 5, p. 453-456, Oct 1988.

REIMÃO, J.Q.; TANIWAKI, N.N.; TEMPONE, A.G. Furazolidone is a selective in vitro candidate against *Leishmania (L.) chagasi* : an ultrastructural study. **Founded as Zeitschrift der Parasitenkunde**, Berlin/Heidelberg, v. 106, n. 6, p. 1465-1469, 2010.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

RIBEIRO, F. C. et al. Use of ELISA employing *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3, p. 200-206, 2007.

ROCHA, R.D.R. et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa de leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.551-562, nov-dez, 2002.

RODRIGUES, A. M. et al. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 139, 2006.

SINGH S, SIVAKUMAR R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6p.307-315, 2004.

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. 2, p. 159-163, 2010.

TRÓPIA DE ABREU, R. et al. Influence of Clinical Status and Parasite Load on Erythropoiesis and Leucopoiesis in Dogs Naturally Infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (Haematopoiesis in *L.(L.) chagasi* Infected Dogs). **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 6, n. 5, p. e18873, 2011.

VÉLEZ, I. et al. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 83, n. 2, p. 351, 2010.

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

ZANINI, M.S. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Immunoblotting analysis for the detection of IgG subclasses in the diagnosis of symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, n.173, p.143-146, 2010.

CAPÍTULO 2

4. CAP. 2 TÍTULO

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA TRATAMENTO E RECIDIVA EM HUMANOS E ANIMAIS: UMA REVISÃO

Artigo submetido ao periódico Arquivos do Instituto Biológico, número: Arq. 046/13.

4.1 RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença difundida nas Américas. Falha terapêutica, toxicidade das drogas, estado imunológico do paciente e recidiva da doença são frequentes desafios enfrentados no tratamento. A recidiva é a forma clínica da doença que ocorre a reativação do parasito na lesão. Pacientes que reativam a lesão possuem um perfil imunológico característico, apresentando um balanço entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Objetiva-se promover uma revisão sobre tratamento e recidiva da LTA, abordando aspectos da evolução da doença, a imunologia e demonstrar estatísticas de recidiva em diversos tipos de tratamentos.

Palavras-chave: *Leishmania*, imunologia, citocinas e LTA.

4.2 ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a disease distributed all over the America. Therapeutic failures, drug toxicity, and the immune status of the patient represent limits in the treatment. Recurrence is the clinical form of the disease that occurs when the parasite reactivates the lesion. Patients with a reactivated lesion usually present with a characteristic immunological profile which is represented by a characteristic balance between proinflammatory cytokines and anti-inflammatory signals. The objective of the present study was to promote a review of treatment and relapse, addressing immunological aspects of the disease. Furthermore, the present work aimed to demonstrate statistical data of relapse in several types of treatment.

Keywords: *Leishmania*, immunology, cytokines, ACL.

4.3 INTRODUÇÃO

O tratamento para a LTA possui diversos desafios, esses principalmente relacionados à toxicidade das drogas utilizadas, falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos, recidiva e resistência dos microrganismos (LIMA et al., 2007). A recidiva ocorre devido à persistência do microorganismo ocasionada pela reativação de um estado latente (MENDONÇA et al., 2004).

As recidivas na leishmaniose podem indicar a seleção de parasitas resistentes ao tratamento, motivo pelo qual é vedado o tratamento de animais com drogas utilizadas no tratamento humano (BRASIL, 2006).

Porcentagens variadas de recidiva da doença foram relatadas na literatura, com variação de 5% a 33% (STRATIGOR, 1980). A leishmaniose recidivante (LR), deve ser diferenciada da leishmaniose cutânea crônica, pois nesse caso, não há remissão completa da lesão (BERLIN, 1940).

O desenvolvimento desta forma clínica é discutido por diversos autores, porém é de consenso, que a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, tem relação direta com a recidiva. Dentre os mecanismos imunológicos, podemos citar que a modulação da atividade antimicrobiana do hospedeiro, a síntese de citocinas inibidoras, a diminuição da atividade das células T e pelo fato do microorganismo se refugiar no interior celular pode acarretar em uma diminuição da resposta imune (BELKAID et al., 2002).

Objetiva-se revisar alguns tipos de tratamentos, abordar aspectos imunológicos da doença, expondo a ocorrência ou não de recidiva nos protocolos terapêuticos.

Recidiva x Recorrência

Na recidiva, a reativação da lesão é o mecanismo mais provável, onde se encontra as mesmas características fenotípicas e genotípicas do parasito é observada na lesão primária e na nova lesão (SARAVIA et al., 1990). Em casos de recidiva devem-se descartar possíveis reinfecções, que caracterizam a recorrência da doença, principalmente em áreas onde a leishmaniose é endêmica (MENDONÇA et al., 2004).

Persistência do microrganismo

De acordo com Oliveira-Neto et al. (1998) a causa de recidiva, provavelmente ocorre pela persistência do parasito no local da lesão. A persistência do parasito foi observada após a cura clínica das lesões em humanos (SCHUBACH et al., 1998), e a recidiva ocorre após uma reativação destes microrganismos (CANNAVÒ et al., 2000), já Mendonça et al. (2004) demonstraram uma alta presença do DNA de *Leishmania* nas lesões curadas, foram observadas presença de formas amastigotas no foco inflamatório em algumas amostras e em torno de 10 % dos casos foram isolados em cultura, esta que posteriormente foi inoculada em hamsters onde observou-se desenvolvimento das lesões características da doença, o que demonstra a persistência e viabilidade do parasito nas lesões do pós cura.

Imunologia

Os neutrófilos possuem funções no início da infecção, são as células responsáveis pela primeira atividade fagocitária da *Leishmania* dando início a secreção de citocina IL-8 com função de aumentar a migração de neutrófilos para o sítio de infecção, de interagir com macrófagos e estimular a produção de interferon-gama (IFN- γ) e após apoptose ocorre liberação de diversas citocinas, promovendo a ativação das células T (AWASTHI et al., 2004). Outro tipo celular que contribui com a ativação das células T são as células dendríticas, estimulando a produção de citocinas como a interleucina 10 (IL-10), a interleucina 12 (IL-12) e IFN- γ (QI et al., 2003).

A resposta imune associada à célula T é o principal mecanismo de defesa associado à leishmaniose (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). Em destaque nessa doença temos as subpopulações de linfócitos T helper 1 (Th1) que produz interferon-gama (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2), com a função de ativar outros linfócitos e macrófagos e a de linfócitos T helper 2 (Th2), produzindo as citocinas anti-inflamatórias interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10), além de ativar linfócitos B aumentando a produção de anticorpos (GOLDSBY et al., 2000)

Na leishmaniose tegumentar, a resposta imunológica, acarreta em uma elevada produção de IFN- γ e TNF- α , a patogênese da lesão da Leishmaniose esta diretamente relacionada com a relação entre interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-10 (IL-10), sendo que a baixa relação indica um prognóstico favorável da doença, ou seja, baixos níveis de IL-10 não são capazes de promover uma eficaz modulação na produção de IFN- γ , pois as mesmas citocinas envolvidas com a morte do parasito pode provocar danos ao tecido e formação da lesão (GOMES-SILVA et al., 2007).

Pacientes que apresentam a forma recidivante da doença possuem uma alta concentração de IFN- γ e uma baixa concentração da citocina antiinflamatória IL-10 (TUON et al., 2008)

Eficácia e recidiva dos tratamentos

Diversas publicações mostram tipos de tratamento que têm sido utilizados na busca da cura da Leishmaniose, sendo que a recidiva é uma barreira constante nessas tentativas (TABELA 01). A incapacidade de cura estéril pode acarretar na recidiva da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

TABELA 1. Diversos tipos de tratamento para leishmaniose tegumentar, porcentagem de recidiva e período de recidiva no pós tratamento.

AUTOR/ANO	TRATAMENTO	AGENTE ENVOLVIDO	% DE RECIDIVA	PERÍODO DE RECIDIVA PÓS TRATAMENTO
EL-ON E HAMBURGER (1987)	Tratamento tópico 12% de paramomicina e 15% de cloreto de metilbenzetônio	<i>L. major</i> ; <i>L. mexicana</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. amazonensis</i>	50%	<i>L. major</i> (135 dias), <i>L. mexicana</i> (120 dias), <i>L. panamensis</i> (25 dias) <i>L. amazonenses</i> (14 dias).
SAENZ et al. (1990)	Cetoconazol (600 mg/dia por 28 dias)	NI*	9%	2 meses
AREVALO et al. (2006)	Imiquimod creme 7,5%	NI*	33%	1-3 meses
GANGNEAUX et al. (2007)	Pentamidina IV. 4 mg/kg	<i>L. guyanensis</i>	33%	3-6 meses
LÓPEZ et al. (2012)	Trat. 1 termoterapia, Trat. 2 antimoniato de meglumine IM 20 mg sb5/kg por 20 dias.	<i>L. (V) panamensis</i> , <i>L. (V) brazililensis</i>	Trat. 1, 4,1%, Trat. 2, 3%	NI*
SOLOMON et al. (2012)	Trat. 1 Anfotericina B 3 mg/kg Trat. 2 estibogluconato de sódio 20 mg/kg	<i>L. (V) brazililensis</i>	Trat. 1, 3%, Trat.2, 10%	NI*

*NI. Não informado na publicação.

Os antimoniais pentavalentes, são as drogas de primeira escolha para o tratamento da LTA em humanos (OLIVEIRA et al., 2011), Solomon et al. (2012), demonstraram atividade de uma droga pertencente a este grupo de 70% na cura da LTA, apresentando índice de recidiva de 29%. Já Netto et al. (1990), observaram recidiva inferior 10% quando utilizou outra droga deste mesmo grupo, enquanto

Lopez et al. (2012), observaram índices de recidiva ainda menores com 3%. As terapias antifúngicas mencionadas no presente trabalho, apresentaram índices de sucesso terapêutico relevante, mesmo sendo a droga de segunda escolha no tratamento da LTA (OLIVEIRA et al., 2011), 89% de cura foram os achados do estudo feito por Sousa et al. (2011), utilizando fluconazol. Solomon et al. (2012) observaram 85% de cura com a anfotericina B lipossomal, com apenas 3% de recidiva, Índices mais altos de 9% de recidiva foi observado em estudo feito por (SAENZ et al., 1990).

Outra droga bastante pesquisada atualmente é a miltefosina, diversos autores estudam sua ação no tratamento da LTA, porém a recidiva é pouco abordada nestes trabalhos, Soto et al. (2008), observaram 88% de cura clínica da LTA em pacientes na Bolívia, achados semelhantes foram encontrados por Van Thiel et al. (2010), que com percentual de 88,2%, Vélez et al. (2010), observaram 69,8%, Machado et al. (2010) com 75% e Chrusciak-Talhari et al. (2011) com 71,4% de cura clínica.

Trabalhos demonstrando terapias tópicas são divididos, nos que utilizam medicamentos ou agentes físicos como o calor topicamente. Ahuja et al. (2012) utilizaram radio frequência induzindo calor para remissão das lesões cutâneas, em cães, com regressão completa da lesão em 45 dias, não observaram recidiva em 16 meses após o tratamento. A utilização tópica de medicamentos como, uma formulação de paramomicina e gentamicina em base hidrofílica obteve 94% de cura no grupo tratado, não observando recidiva nos 180 dias pós-tratamento (BEN SALAH et al., 2009). Já Alavi-Naini, (2008), utilizaram morfina topicamente no tratamento da LTA, explorando a ação imunomoduladora deste fármaco.

4.4. CONCLUSÃO

Em conclusão, todos estes achados despertam ainda mais a curiosidade dos pesquisadores quanto à ação dos fármacos diante a LTA, a relevante e necessária cura estéril, a persistência de parasitos resistentes e os índices de recidiva, estando todos estes fatores relacionados inquestionavelmente com a imunologia do paciente.

4.5. REFERÊNCIAS

AHUJA, A. A. et al. Successful treatment of canine cutaneous leishmaniasis using radio-frequency. ***American journal of tropical medicine and hygiene***, v. 87, n. 2, p. 261-263, 2012.

ALAVI-NAINI, R. Topical morphine for the treatment of cutaneous leishmaniasis. ***Medical Hypotheses***, v. 70, n. 1, p. 81-84, 2008.

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

AREVALO, I. et al. Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. ***Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America***, v. 44, n. 12, p. 1549, 2006.

BELKAID, Y., et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. ***Nature***, London, v. 420, p. 502-507, 2002.

BEN SALAH, A. et al. WR279,396, a Third Generation Aminoglycoside Ointment for the Treatment of *Leishmania major* Cutaneous Leishmaniasis: A Phase 2,

Randomized, Double Blind, Placebo Controlled Study (Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, USA, v. 3, n. 5, p. e432, 2009.

BERLIN, C. Leishmania recidiva cutis: Leishmanid. **Arch Dermatol Syphilol** ,v 41, p. 874-885, 1940.

BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.28, n.1, p.121-134, Jan., 1998.

BUMB, R. A. et al. Efficacy of short-duration (twice weekly) intralesional sodium stibogluconate in treatment of cutaneous Leishmaniasis in India. **The British journal of dermatology**, v. 163, n. 4, p. 854, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** – 1ª. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 120 p., 2006.

CANNAVÒ, S. P.; VACCARO, M.; GUARNERI, F. Leishmaniasis recidiva cutis. **International Journal of Dermatology**, Oxford, UK, v. 39, n. 3, p. 205-206, 2000.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. et al. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 2, p. 255, 2011.

EL-ON, J.; HAMBURGER, A. D. Topical treatment of New and Old World cutaneous leishmaniasis in experimental animals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 734-737, 1987.

GANGNEUX, J.-P. et al. Recurrent American Cutaneous Leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 1436-1438, 2007.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B. A. Kuby Immunology. **W.H. Freeman and Company, New York, USA**, 4 ed. 670p, 2000.

GOMES-SILVA, A. et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical & Experimental Immunology**, Oxford, UK, v. 149, n. 3, p. 440-444, 2007.

LAUFS, H. et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and immunity**. v. 70, p 826-35, 2002.

LIMA, E. B. D. et al. Treatment of american cutaneous leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, p. 111-124, 2007.

LOPEZ, L. et al. Thermotherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **TRIALS**, v. 13, 2012.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial (Miltefosine for *L. braziliensis* CL). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, USA, v. 4, n. 12, p. e912, 2010.

MENDONCA, M. G. et al. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?(Major Article). **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 6, p. 1018, 2004.

NETTO, E. M. et al. Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime ®. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 3, p. 367-370, 1990.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

OLIVEIRA-NETO, M. P. et al. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, Oxford, UK, v. 37, n. 11, p. 846-849, 1998.

QI, H.; DENNING, T. L.; SOONG, L. Differential Induction of Interleukin-10 and Interleukin-12 in Dendritic Cells by Microbial Toll-Like Receptor Activators and Skewing of T-Cell Cytokine Profiles. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3337, 2003.

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgraduate medical journal**, v. 82, n. 972, p. 649, 2006.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143-148, Jan 1998.

SAENZ, R. E.; PAZ, H.; BERMAN, J. D. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Medicine**, v. 89, n. 2, p. 147-155, 1990.

SARAVIA, N. G. et al. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection—reactivation or reinfection? **The Lancet**, v. 336, n. 8712, p. 398-402, 1990.

SCHUBACH, A. et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **The Journal of infectious diseases**, v. 178, n. 3, p. 911, 1998.

SMELT, S. C., et al. B cell deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. **Journal Immunology**, v. 164, p. 3681-3688, 2000.

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

SOLOMON, M. et al. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis in travelers. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2012.

SOTO, J. et al. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 2, p. 210, 2008

SOUSA, A. Q. et al. High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis*. **Clinical infectious diseases**

: **an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 53, n. 7, p. 693, 2011.

STRATIGOR, J. D. New aspects on cutaneous leishmaniasis. **Dermatologie Beruf Umwelt**, v. 1, n. 28, p. 139-148, 1980.

TUON, F. F. et al. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. **Clinical Immunology**, v. 128, n. 3, p. 442-446, 2008.

TUON, F. F. et al. **Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis**. Oxford, UK. 47: 109-124 p. 2008.

VAN THIEL, P. P. A. M. et al. Miltefosine treatment of *Leishmania major* infection: an observational study involving Dutch military personnel returning from northern Afghanistan. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 50, n. 1, p. 80, 2010.

VÉLEZ, I. et al. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 83, n. 2, p. 351, 2010.

5. CONCLUSÃO

Os achados provenientes deste trabalho indicam a ação terapêutica da FZ na remissão das lesões produzidas pela *L. (V.) braziliensis* auxiliando no controle da enfermidade, entretanto, mais pesquisas deverão ser realizadas para avaliar a cura estéril dos animais infectados.

6. REFERÊNCIAS

AHUJA, A. A. et al. Successful treatment of canine cutaneous leishmaniasis using radio-frequency. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 2, p. 261-263, 2012.

ALAVI-NAINI, R. Topical morphine for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Medical Hypotheses**, v. 70, n. 1, p. 81-84, 2008.

ALI, B. H. Pharmacological, Therapeutic and Toxicological Properties of Furazolidone: Some Recent Research. An International Journal Publishing Topical Reviews and **Research Articles on all Aspects of the Veterinary Sciences, Dordrecht**, v. 23, n. 6, p. 343-360, 1999.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence (Leishmaniasis Worldwide and Estimates of Incidence). **PLoS ONE, San Francisco, USA**, v. 7, n. 5, p. 2012.

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

AIOCCO, P. et al. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2603, 2009.

BARBOSA, G. M. S. et al. Epidemiological aspects of canine american tegumentary leishmaniasis in the Municipality of Paraty, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, p. 641-646, 1999.

BEN SALAH, A. et al. WR279,396, a Third Generation Aminoglycoside Ointment for the Treatment of *Leishmania major* Cutaneous Leishmaniasis: A Phase 2, Randomized, Double Blind, Placebo Controlled Study (Topical Treatment of

Cutaneous Leishmaniasis). **PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, USA**, v. 3, n. 5, p. e432, 2009.

BERENS, R. L. et al. Antileishmanial effect of allopurinol and allopurinol ribonucleoside on intracellular forms of *Leishmania donovani*. **Biochemical Pharmacology**, v. 29, n. 17, p. 2397-2398, 1980.

BERMAN, J. D. et al. Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes in murine macrophage tumor cells. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 85-92, 1986.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infection Disease**. v. 24, p. 684-703. 1997.

BERZUNZA-CRUZ, M. et al. PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. **Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde, Berlin/Heidelberg**, v. 104, n. 3, p. 691-699, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRITO, M.E.F. et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, n.2, p.318-321, 2000.

BUMB, R. A. et al. Efficacy of short-duration (twice weekly) intralesional sodium stibogluconate in treatment of cutaneous leishmaniasis in India.(Report). **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 4, p. 854, 2011.

CANNAVÒ, S. P.; VACCARO, M.; GUARNERI, F. Leishmaniasis recidiva cutis. **International Journal of Dermatology**, Oxford, UK, v. 39, n. 3, p. 205-206, 2000.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an emerging infection. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, p. 175-182, 2001.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. et al. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 2, p. 255, 2011.

COSTA, J. M. L. et al. Furazolidone treatment of cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 2, p. 274-274, 1985.

CUMMINGS, H. E. et al. Critical role for phosphoinositide 3-kinase gamma in parasite invasion and disease progression of cutaneous leishmaniasis. (MEDICAL SCIENCES)(Author abstract). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 109, n. 4, p. 1251, 2012.

CURTI, M. C. D. et al. Epidemiological and clinical characteristics of cutaneous leishmaniasis and their relationship with the laboratory data, south of Brazil. **Brazil Journal of Infection Disease**, v. 15, n. 1, p. 12-16, 2011.

DAVIDSON, R. N. Leishmaniasis. **Medicine**, v. 33, n. 8, p. 43-46, 2005.

DOS SANTOS, I. B. et al. Sporotrichosis-The main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 1-6, 2007.

ESCOBAR M.A., et al. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tegumentary): a diagnostic challenge. **Tropical doctor**. v. 22, p. 69-78, 1992.

FALQUETO, A. et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.81, n.2, p.155-163.1986.

FALQUETO, A. et al. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil: further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.86, n.4, p.499-500, 1991.

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

FERREIRA, A.L. et al. Distribution of Sand Flies (Diptera: *Psychodidae*) at Different Altitudes in an Endemic Region of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.8, p.1061-1067, 2001.

FIGUEREDO, L. A. et al. Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*-infected dogs from Pernambuco, Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 21, n. 4, p. 418, 2012.

GALAÏ, Y. et al. Diagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis by detection of *Leishmania* antibodies and leishmania DNA in oral fluid samples collected using an Oracol device. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3150, 2011.

GENARO, O. et al. Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87, n.1, p.163-164, 1992.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine**, v. 25, n. 44, p. 7674-7686, 2007.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B. A. Kuby Immunology. W.H. **Freeman and Company, New York, USA, 4 ed.** 670p, 2000.

GOMES & SILVA, A. et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical & Experimental Immunology**, Oxford, UK, v. 149, n. 3, p. 440-444, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. L. R. D. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

HERMETO, M.V. et al. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Doce Valley, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro** v.89, n.4, p.519-521, 1994.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis.(Review). **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191, 1999.

KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of Domestic Animals.** 5 ed. New York. Academic Press, 932p. 1997.

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

LACHAUD, L. et al. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210, 2002.

LIMA, E. B. D. et al. Treatment of american cutaneous leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, p. 111-124, 2007.

LOUZIR, H. et al. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **The Journal of infectious diseases**, v. 177, n. 6, p. 1687, 1998.

MACHADO PINTO J. Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas. **Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro**, p.319-328,1994.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial (Miltefosine for *L. braziliensis* CL). **PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, USA**, v. 4, n. 12, p. e912, 2010.

MADEIRA, M. et al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? **Parasitology research, Berlin/Heidelberg**, v. 97, n. 1, p. 73-76, 2003.

MANSON-BAHR P.E. Diagnosis.In: The Leishmaniasis. London, **Peters W. & Kilich-Kendrick R**, v.2, p.703-728, 1987.

MARGONARI, C. et al. Public Knowledge about and Detection of Canine Visceral Leishmaniasis in Urban Divinópolis, Brazil. 2012.

MARTINEZ, V. et al. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation.(Short report)(Report). **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 57, 2012.

MATTHEW, E. R. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463, 2004.

MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 14-21, 2006.

MENDONCA, M. G. et al. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?(Major Article). **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 6, p. 1018, 2004.

MEYER, D. J., HARCEY, J. W. **Veterinary Laboratory Medicine** Philadelphia, W. B. Saunders, 2. ed, 373p., 1998.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NAIFF MF.et al. Leishmaniose tegumentar americana na amazônia: distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 243, 1999.

NEAL, R. A.; VANBUEREN, J.; HOOPER, G.The activity of nitrofurazone and furazolidone against *Leishmania donovani*, *L. major* and *Leishmania enriettii* in vitro and in vivo. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 82, n. 5, p. 453-456, 1988.

NETA, A. V. C. et al. Flow cytometry used in canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 480-488, 2006.

NETTO, E. M. et al. Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime ®. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 3, p. 367-370, 1990.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

OLIVEIRA-NETO, M. P. et al. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, Oxford, UK, v. 37, n. 11, p. 846-849, 1998.

PERINOTO, A. C. et al. Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: innovations in bioanalytics for a neglected disease.(Author abstract)(Report). **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 23, p. 9763, 2010.

PISSINATE, J. F. et al. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti- *Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**, v. 336, n. 2, p. 193-202, 2008.

QI, H.; DENNING, T. L.; SOONG, L. Differential Induction of Interleukin-10 and Interleukin-12 in Dendritic Cells by Microbial Toll-Like Receptor Activators and Skewing of T-Cell Cytokine Profiles. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3337, 2003.

QUINTELLA, L. P. et al. Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. **Brazilian Journal of Dermatology**, v. 167, n. 4, p. 837-846, 2012.

RANGEL, E. F. et al. Variation between geographical populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera: *Psychodidae*: *Phlebotominae*) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 43, 1996.

REIMÃO, J.Q.; TANIWAKI, N.N.; TEMPONE, A.G. Furazolidone is a selective in vitro candidate against *Leishmania (L.) chagasi* : an ultrastructural study. **Founded as Zeitschrift der Parasitenkunde**, Berlin/Heidelberg, v. 106, n. 6, p. 1465-1469, 2010.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143-148, Jan 1998.

ROCHA, R. D. R. et al. Anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in american cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 551-562, 2002.

RODRIGUES, A. M. et al. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 139, 2006.

RUITER, G. A. et al. Anti-cancer alkyllysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. **Anticancer Drugs**, v. 14, p. 167-73, 2003.

SANTOS, G.P.L. et al. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, p.161-166, 2005.

SARAVIA, N. G. et al. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection-reactivation or reinfection? **The Lancet**, v. 336, n. 8712, p. 398-402, 1990.

SARAVIA, N. G. L. et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis, **Journal of Infectious Diseases**, v. 159, p. 725-735, 1989.

SCHUBACH, A. et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **The Journal of infectious diseases**, v. 178, n. 3, p. 911, 1998.

SESSA, P. A.; FALQUETO, A.; VAREJÃO, J. B. Attempted control of mucocutaneous leishmaniasis through treatment of diseased dogs. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 10, n. 4, p. 457, 1994.

SILVA, D. A. et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1, p. 257-261, 2011.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, Tokyo, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

SOLOMON, M. et al. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis in travelers. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2012.

SOTO, J. et al. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 2, p. 210, 2008

SOUSA, A. Q. et al. High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis*. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 53, n. 7, p. 693, 2011.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 1-6, 2011.

SZARGIKI, R. et al. Comparison of Serological and Parasitological Methods for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis in the State of Paraná, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13, n.1, p.47-52, 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. 2, p. 159-163, 2010.

TUON, F. F. et al. **Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis**. Oxford, UK. 47: 109-124 p. 2008.

VALENCIA, B. M. et al. Non-Invasive Cytology Brush PCR for the Diagnosis and Causative Species Identification of American Cutaneous Leishmaniasis in Peru (Cytology Brush PCR for Leishmania Detection). San Francisco, USA, v. 7, n. 11, p. e49738, 2012.

VAN THIEL, P. P. A. M. et al. Miltefosine treatment of *Leishmania major* infection: an observational study involving Dutch military personnel returning from northern Afghanistan. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 50, n. 1, p. 80, 2010.

VÉLEZ, I. et al. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 83, n. 2, p. 351, 2010.

VIRGENS, T. M.; SANTOS, C. B.; PINTO, I. S. Phlebotomine sandflies (Diptera, *Psychodidae*) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v.24, n.12, p.2969-2978, dez, 2008.

VROOMEN, L. H. M. et al. Reversible interaction of a reactive intermediate derived from furazolidone with glutathione and protein. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 95, n. 1, p. 53-60, 1988.

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

ZANINI, M.S. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Immunoblotting analysis for the detection of IgG subclasses in the diagnosis of symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, n.173, p.143-146, 2010.