



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**FARMACOCINÉTICA DO ALOPURINOL EM CÃES TRATADOS PARA  
LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE ADQUIRIDA**

**Clauceane de Jesus**

**SALVADOR - BA**

**Março - 2017**

**CLAUCEANE DE JESUS**

**FARMACOCINÉTICA DO ALOPURINOL EM CÃES TRATADOS PARA  
LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE ADQUIRIDA**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Stella Maria Barrouin Melo

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Leonor Pardo Campos Godoy

SALVADOR – BA

Março - 2017

*"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."*

**José de Alencar**

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mãe Julieta e a meu irmão Jacson pela paciência e amor incondicional. Meu irmão que foi o exemplo de vida e perseverança que me motivou a continuar em busca do conhecimento, apesar das dificuldades, e sempre me apoiou nas minhas decisões.

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, que a cada dia me tornou mais forte e não me deixou desistir em um só momento.

À minha família por todo apoio ao longo da caminhada e pela compreensão da minha ausência.

Agradeço a minha orientadora Dr<sup>a</sup> Stella Maria Barrouin Melo, pela orientação, confiança, por toda paciência, dedicação, atenção e sugestão de ideias para o desenvolvimento deste trabalho. E pelo incentivo de mostrar a minha capacidade quando eu não acreditava que era capaz.

A minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Ana Leonor Pardo Campos Godoy, por toda atenção, paciência e tempo gasto que dedicava para me fazer compreender o assunto.

Sou grata a Dr<sup>a</sup> Daniela Farias Larangeira por todo conhecimento passado, pela amizade e pela orientação.

Agradeço a vocês meninas, meu braço direito e esquerdo. Gabriela Porfírio e Rafaela Gonçalves vocês foram peças fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho. Nossa equipe é nota 10, porque trabalhamos com amor e sempre com solidariedade e gratidão em ajudar uma a outra para conclusão dos nossos trabalhos. Tiveram momentos de tempestades, mas estávamos unidas, sempre disposta em ajudar uma a outra no que fosse possível. O que mais falar de vocês? Acho que palavras não expressam tamanha gratidão. Convenhamos que Clau não é muito de falar... *Minions*

Grata aos estagiários do Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE) Emanuelle, Larissa, Raíza, em especial a Mayro e Mariana que estavam sempre dispostos a ajudarem na etapa de coleta. #TEAMLIVE

Aos meus amigos que nos momentos de desespero estavam ali sempre abertos a ouvirem o meu desabafo, agradeço pelas palavras de consolo, pelos conselhos de superação, força, por me mostrar a pessoa guerreira e batalhadora que eu sou, mas esquecia de acreditar. Sou grata pela amizade de vocês, Ester, Géssica, Edilane, Verena e Roseclea.

Agradeço aos meus pequenos de quatro patas, que foram a peça fundamental para a realização desse trabalho.

Agradeço a equipe do Laboratório de Farmacocinética e metabolismo da USP.

Sou grata a todos os amigos e colegas que ajudaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Formas promastigotas de <i>Leishmania sp.</i> .....	18
<b>Figura 2:</b> Formas amastigotas de <i>Leishmania sp.</i> em macrófagos.....	18
<b>Figura 3:</b> Ciclo biológico da transmissão da <i>Leishmania infantum</i> ao vetor e aos hospedeiros mamíferos.....	19
<b>Figura 4:</b> Esquema demonstrativo do curso da disseminação da <i>Leishmania sp.</i> no organismo do hospedeiro vertebrado.....	20
<b>Figura 5:</b> Resposta imune do hospedeiro infectado por <i>Leishmania infantum</i> ....	21
<b>Figura 6:</b> Diferentes alterações dermatológicas em cães com leishmaniose: A- Lesão ulcerativa interdigital, B- lesão ulcerativa em área de contato no membro anterior; C- Dermatite nodular na face e região interna da orelha; D- Onicogribose; E- Alopecia periocular; F- Vasculite em ponta de orelha. ....	24
<b>Figura 7:</b> Estrutura do alopurinol.....	28
<b>Figura 8:</b> Fluxograma demonstrativo da farmacocinética do alopurinol em humanos.....	31
<b>Figura 9:</b> Mecanismo de ação do alopurinol sobre a enzima xantina oxidase.....	31
<b>Figura 10:</b> Metabolismo do alopurinol em humanos e na <i>Leishmania sp.</i> .....	33
<b>Figura 11:</b> Procedimento de extração líquido-líquido do alopurinol e oxipurinol em plasma canino. ....	39
<b>Figura 12:</b> Cromatogramas para análise de alopurinol e oxipurinol em plasma canino: A) plasma branco; B) Solução padrão de 5 µg/mL plasma; C) Amostra de plasma coletada no tempo de 2h após a administração por via oral de 10mg/kg de alopurinol. 1 = Oxipurinol; 2 = Alopurinol; 3 = Aciclovir (Padrão Interno).....	51
<b>Figura 13:</b> Curva de concentração plasmática vs tempo de alopurinol e oxipurinol após a administração oral de 10mg/kg de alopurinol. Média ± erro padrão da média.....	52
<b>Figura 14:</b> Relação entre <i>clearance</i> vs Peso dos cães com leishmaniose que estavam em uso de alopurinol com dose múltipla, 10mg/Kg, duas vezes ao dia.....	54

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> - Identificação dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> em uso de alopurinol.....	42
<b>Tabela 2</b> –Perfil hematológico e bioquímico com Média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo dos parâmetros dos cães infectados por <i>Leishmania infantum</i> após o uso contínuo do alopurinol.....	45
<b>Tabela 3</b> –Sumário de urina de cães infectados naturalmente por <i>Leishmania infantum</i> e em uso de alopurinol a cada 12 horas.....	48
<b>Tabela 4</b> – Limites de confiança do método de análise de alopurinol e oxipurinol em plasma de cão.....	50
<b>Tabela 5</b> – Parâmetros farmacocinéticos do alopurinol no plasma de cão. Dados individuais com média e desvio padrão (DP) .....	53
<b>Tabela 6</b> – Parâmetros farmacocinéticos do oxipurinol no intervalo de 0-12 horas no plasma de cão. Dados individuais com média e desvio padrão (DP)....	53
<b>Tabela 7</b> – Dados dos parâmetros farmacocinéticos C <sub>max</sub> e AUC normalizados em função da dose.....	55

**LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1:</b> Alterações clínicas observadas no exame clínico dos cães com leishmaniose que estavam sob tratamento com alopurinol, no momento da coleta de amostras para estudo farmacocinético de alopurinol e oxipurinol.....	43
---	----



**LISTA DE SIGLAS**

- AMP - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATP – Adenosina trifosfato
- AUC – Área sob a curva concentração plasmática
- CBQ – Controle de qualidade de baixa concentração
- CQM – Controle de qualidade de média concentração
- CQA – Controle de qualidade de alta concentração
- DPP - *Dual Parth Platform*
- EPR – Erro padrão relativo
- GMP – Guanosine 5'-monophosphate oxidoreductase
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
- IFI – Imunofluorescência indireta
- IFN- $\gamma$  - Interferon gama
- IgG – Imunoglobulina G
- IL-2 – Interleucina 2
- IL-4 - Interleucina 4
- IL-5 - Interleucina 5
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-12 - Interleucina 12
- LIQ – Limite inferior de quantificação
- LVA – Leishmaniose visceral americana
- LVC – Leishmaniose visceral canina
- LV – Leishmaniose visceral
- Kel - Constante de velocidade de eliminação
- RNA – Ácido ribonucleico
- RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucleico mensageiro
- Th1 – Células auxiliares da resposta celular
- Th2 – Células auxiliares da resposta humoral
- TNF – Fator de necrose tumoral
- UPC - Relação proteína/creatinina urinária

**ANEXOS**

	<b>Página</b>
<b>Anexo 1</b> - Resultado da urinálise dos cães estudados .....	78
<b>Anexo 2</b> - Perfil hematológico de cães infectados com <i>Leishmania infantum</i> em uso contínuo de alopurinol .....	79
<b>Anexo 3</b> - Bioquímica sérica de cada cão infectado com <i>Leishmania infantum</i> .....	80
<b>Anexo 4</b> – Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) .....	81

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1. Introdução .....	15
2. Revisão de Literatura.....	17
2.1. Aspectos epidemiológicos da LV canina .....	17
2.1.1. A <i>Leishmania Infantum</i> .....	17
2.1.2. Ciclo biológico do parasito.....	18
2.2. Aspectos fisiopatológicos da infecção por <i>L. infantum</i> no cão.....	19
2.3. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina.....	23
2.4. Diagnóstico da infecção e da doença canina.....	24
2.5. Aspectos do tratamento antiparasitário em cães.....	26
2.6. Aspectos farmacológicos do alopurinol.....	27
2.6.1. Farmacocinética do alopurinol.....	29
2.6.2. Aspectos da farmacodinâmica do alopurinol.....	31
2.6.3. Ação da droga na <i>Leishmania</i> .....	32
3. Hipótese do trabalho.....	34
4. Objetivos.....	34
4.1. Objetivo geral.....	34
4.2. Objetivos específicos.....	34
5. Material e métodos.....	35
5.1. Protocolo experimental e aspectos éticos.....	35
5.1.1. Avaliação clínica dos cães .....	35
5.1.2. Procedimento de coleta de sangue e urina .....	36
5.2. Padronização do método de HPLC-UV para dosagem de alopurinol no plasma canino.....	37
5.2.1. Soluções padrão e Reagentes .....	37
5.2.2. Análise cromatográfica.....	38
5.2.3. Procedimento de preparo das amostras.....	38
5.3. Validação do método de HPLC-UV .....	40
5.3.1. Recuperação .....	40

5.3.2. Limite de quantificação e linearidade.....	40
5.3.3. Precisão e exatidão.....	40
5.4. Estabilidade.....	41
5.5. Análise farmacocinética e Estatística.....	41
6. Resultados.....	42
6.1. Validação do método em cromatografia líquida de alta eficiência com detector Ultra-violeta (HPLC-UV). ....	49
7. Discussão.....	56
8. Conclusões.....	67
9. Referências bibliográficas.....	68

## Farmacocinética do alopurinol em cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida

### RESUMO

Trata-se de um estudo clínico prospectivo sobre a farmacocinética do alopurinol em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e domiciliados com seus responsáveis em área endêmica para leishmaniose visceral (LV). O objetivo do estudo foi determinar os parâmetros farmacocinéticos do alopurinol e seu metabólito oxipurinol em cães em tratamento para LV canina. Para tanto, foram avaliados 11 cães, que passaram por avaliação clínica e laboratorial. Para o estudo da farmacocinética, foram coletadas amostras de sangue de cada cão antes e 12h após a administração do alopurinol, por via oral, na dose de 10mg/kg, nos tempos 0' 15', 30', 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 7; 10; 12 h. Amostras de urina foram coletadas nos tempos 0-3 h; 3-6 h; 6-9 h; 10-12 horas após administração do fármaco. Na avaliação clínica dos cães, os sinais mais frequentes foram linfadenomegalia, mucosas hipocaradas e alterações dermatológicas. Na análise dos exames laboratoriais, observou-se anemia em 18,2% (2/11) dos cães, hiperproteinemia em 45,4% (5/11), hiperglobulinemia em 81,8% (9/11), hipoalbuminemia em 81,8% (9/11), e níveis elevados de ALT em 18,2% (2/11) e FA em 18,2% (2/11) dos cães. A razão proteína-creatinina urinária (UPC) estava alterada em 36,4% (4/11) dos cães, porém dois tinham valores limítrofes e cinco dentro da normalidade. Na urinálise, observou-se proteinúria em 63,6% (7/11), hematúria em 9,1% (1/11), leucocitúria em 27,3% (3/11), bacteriúria em 63,6% (7/11), cristais de urato de amônio em 9,1% (1/11), cristais de urato amorfos 9,1% (1/11) e cristais de xantina em 9,1% (1/11) dos cães. Os resultados da análise de patologia clínica foram utilizados para avaliar o grau de comprometimento funcional dos órgãos acometidos pela doença nos cães. A determinação das concentrações de alopurinol e oxipurinol foram realizados por meio da técnica de HPLC de alta eficiência com leitura por UV, validada no presente estudo. Os parâmetros farmacocinéticos encontrados para o alopurinol foram  $C_{max}$  de  $6,00 \pm 1,78 \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max}$  de  $1,50 \pm 0,67 \text{ h}$ ,  $K_{el}$  de  $0,31 \pm 0,17 \text{ por h}$ , e  $V_d/F/Kg$  de  $1,37 \pm 0,83 \text{ L/Kg}$ . O intervalo de "clearance" (Cl) encontrado foi de  $0,35 \pm 0,11 \text{ L/h/Kg}$ , e a área sob a curva (AUC) de  $27,20 \pm 7,80 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ . Para o oxipurinol, foram obtidos  $C_{max}$  de  $3,08 \pm 0,68 \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max}$  médio de  $5,90 \pm 3,60 \text{ h}$  e AUC de  $33,87 \pm 13,10 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ . Dessa forma, as médias dos dados farmacocinéticos obtidos para cães portadores da leishmaniose, que na sua maioria se encontravam entre estágio I e II da doença, foram próximos aos descritos na literatura para cães saudáveis. Conclui-se que para cães em estágios leve ou controlado da doença, a farmacocinética do alopurinol comporta-se como no cão saudável.

**Palavras-chave:** farmacocinética, alopurinol, leishmaniose visceral canina, urina, plasma

## Pharmacokinetics of allopurinol in dogs treated for naturally acquired visceral leishmaniasis

### ABSTRACT

This is a prospective clinical study of the pharmacokinetics of allopurinol in dogs naturally infected by *Leishmania sp.* and domiciled with their guardians in an endemic area for visceral leishmaniasis (VL). The aim of the study was to determine the pharmacokinetic parameters of allopurinol and its metabolite oxypurinol in dogs undergoing treatment for canine visceral leishmaniasis. We evaluated 11 dogs that underwent clinical and laboratory evaluation. For the pharmacokinetic study, blood samples from each dog were collected before and 12 hours after the administration of allopurinol, orally, at a dose of 10mg / kg, at times 0 '15', 30 ', 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 4; 5; 7; 10; 12 h. Urine samples were collected at 0-3 h; 3-6 h; 6-9 h; 10-12 hours after the drug administration. The most frequent signs observed in the clinical evaluation of the dogs were lymphadenomegaly, pale mucosa and dermatological alterations. Laboratory tests evidenced anemia in 18.2% (2/11) of the dogs, hyperproteinemia in 45.4% (5/11), hyperglobulinemia in 81.8% (9/11), hypoalbuminemia in 81.8% (9/11), elevated ALT levels in 18.2% (2/11), and high FA values in 18.2% (2/11) of the dogs. The urinary protein-creatinine ratio (UPC) was altered in 36.4% (4/11) of the dogs, two had borderline values and five results within the normal value. The urinalysis resulted in proteinuria in 63.6% (7/11), hematuria in 9.1% (1/11), leukocyturia in 27.3% (3/11), bacteriuria in 63.6% (7/11), ammonium urate crystals in 9.1% (1/11), amorphous urate crystals 9.1% (1/11), and xanthine crystals in 9.1% (1/11) of the dogs. The results of the clinical pathology analysis were used to evaluate the degree of functional impairment of the organs affected by the disease in dogs. The concentrations of allopurinol and oxypurinol were determined by HPLC with UV reading technique. The pharmacokinetic parameters found for allopurinol were  $C_{max}$  of  $6.00 \pm 1.78 \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max}$  of  $1.50 \pm 0.67$  h,  $K_{el}$  of  $0.31 \pm 0.17$  per h, and  $V_d/F/kg$  of  $1.37 \pm 0.83$  L/Kg. The *clearance* interval (CI) was  $0.35 \pm 0.11$  L/h/kg, and the area under the curve (AUC) was  $27.20 \pm 7.80$  h\* $\mu\text{g/mL}$ . The values for oxypurinol were  $C_{max}$  of  $3.08 \pm 0.68 \mu\text{g} / \text{mL}$ , mean  $T_{max}$   $5.90 \pm 3.60$  h, and the area under the curve of  $33.87 \pm 13.10$  h\* $\mu\text{g/mL}$ . Thus, the average values of the pharmacokinetic data obtained for dogs with leishmaniasis, which were mostly between stages I and II of the disease, were close to those described in the literature for healthy dogs. We can conclude that for dogs in mild or controlled stages of disease, the pharmacokinetics of allopurinol behave as in healthy dogs.

**Keywords:** pharmacokinetics, allopurinol, canine visceral leishmaniasis, urine, plasma

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses, doenças causadas por diferentes espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, são endêmicas em 98 países com mais de 350 milhões de pessoas em risco (BRASIL, 2006; WHO, 2010). *Leishmanias* spp. causam doenças cutâneas, mucocutâneas e viscerais em seres humanos, em cães e em outros mamíferos. A leishmaniose visceral (LV) apresenta ampla distribuição mundial. Na América Latina, a doença é endêmica em pelo menos 12 países e 90% dos casos ocorrem no Brasil, principalmente na Região Nordeste (BRASIL, 2006; JULIÃO et al., 2007).

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é considerado a principal fonte de infecção, assim como as raposas (*Pseudalopex ventulus*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) são considerados reservatórios mais importantes no ambiente silvestre (CAMARGO et al., 2007).

A LV canina tem caráter zoonótico e é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Sua transmissão aos hospedeiros vertebrados ocorre por meio da picada de vetores dípteros, da família Phlebotominae, no momento do repasto sanguíneo (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007; SOLANO-GALLEGO, et al., 2011). É uma doença de grande importância na saúde pública seja pela sua letalidade, expansão geográfica ou pela alta incidência (GONTIJO; MELO, 2004; FIGUEREIDO et al., 2010).

Os cães infectados por *L. infantum* podem apresentar diferentes manifestações clínicas (FERRER, 1999; SILVA, 2007). A infecção em cães pode ser subclínica ou se manifestar como uma doença auto-limitada. Na maioria das vezes, entretanto, a LV canina é sistêmica e pode envolver qualquer órgão, tecido ou fluido corporal e se não houver tratamento pode ser fatal (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

O diagnóstico clínico da LV canina é impreciso, devido à não especificidade e variedade dos sinais clínicos, o que torna necessário o diagnóstico laboratorial por meio de exames sorológicos, parasitológicos e moleculares (AGUIAR et al., 2007; MICHALSKY et al., 2007).

Como no Brasil o tratamento da LV canina não é permitido com o uso de drogas usadas no tratamento da LV humana, uma alternativa seria a associação de drogas de segunda escolha de acordo com a literatura medico-veterinária internacional, em busca do controle da infecção. O alopurinol tem sido descrito com frequência em publicações

sobre o tratamento da LV canina, principalmente em associação com outros fármacos (AMUSATEGUI, 1998; GINEL et al., 1998; DENEROLLE; BOURDOISEAU, 1999), mas também como droga única (DENEROLLE; BOURDOISEAU, 1999; PLEVRAKI et al., 2006).

O alopurinol é um análogo da hipoxantina, e seu metabólito ativo é o oxipurinol. Esse fármaco é mais conhecido na medicina humana por ser utilizado no tratamento de hiperuricemia primária da gota e hiperuricemia secundária a outras desordens hematológicas, ou na terapia anti-neoplásica (GRAHAM et al., 1996; GUERRA et al., 2001). Na medicina veterinária, o alopurinol tem sido empregado para dissolução de urólitos formados por cálculos de urato de amônia em cães, comumente da raça Dálmata, que apresentam predisposição à sua formação (AMUSATEGUI, 1998; GINEL et al., 1998; GUERRA et al., 2001; ANDRADE, 2008). Nos mamíferos, o alopurinol age por inibição da enzima xantina oxidase, enzima que catalisa a formação de hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico, reduzindo sua concentração sérica (MURREL et al., 1986; GUERRA et al., 2001; DAY et al., 2007; ANDRADE, 2008). O mecanismo antiparasitário do alopurinol está relacionado com a formação de ribonucleotídeo de alopurinol pela *Leishmania*, com a adição de um grupo amina, formando aminopirazolopirimidina, que é incorporada ao RNA, e assim inibindo a síntese proteica no protozoário (PFALLER; MARR 1974, MARR et al., 1978; ELION, 1993).

Há estudos publicados sobre a farmacocinética do alopurinol em humanos (WRIGHT et al., 2013; DAY et al., 2007), porém são escassos os estudos publicados em cães, sendo um deles dedicado à farmacocinética do alopurinol em cães Dálmatas saudáveis (LING et al., 1997) e um outro avaliando a influência da dieta sobre os parâmetros farmacocinéticos e a biodisponibilidade do alopurinol e oxipurinol em cães Beagles saudáveis (BARTGES et al., 1997a, b).

Embora seja um fármaco empregado em vários protocolos anti-*Leishmania* na LV canina descritos na literatura, não há estudos sobre parâmetros farmacocinéticos do alopurinol ou do oxipurinol em cães sob tratamento para LV com essa droga.

Considerando a falta de informação na literatura sobre a farmacocinética do alopurinol em cães com leishmaniose, buscou-se investigar a influência da doença sobre a farmacocinética do alopurinol e oxipurinol em cães que fazem uso contínuo do fármaco em dose múltipla.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos epidemiológicos da LV canina

A LV é uma doença negligenciada e tem ampla distribuição na Ásia, na Europa, na África, no Oriente Médio e nas Américas, onde também é conhecida como calazar neo-tropical ou leishmaniose visceral americana (LVA). A LV é considerada doença endêmica no Brasil, está distribuída em 21 unidades da federação e atinge as cinco regiões brasileiras (BRASIL, 2010). Na América Latina, a LV já foi descrita no mínimo em 12 países, sendo que na década de 90, aproximadamente 90% dos casos ocorreram no Brasil, especialmente na Região Nordeste (BRASIL, 2006; JULIÃO et al., 2007). Na medida em que a doença se expandiu para as outras regiões brasileiras e atingiu áreas urbanas e periurbanas, a Região Nordeste passou a apresentar 48% dos casos do país (BRASIL, 2010).

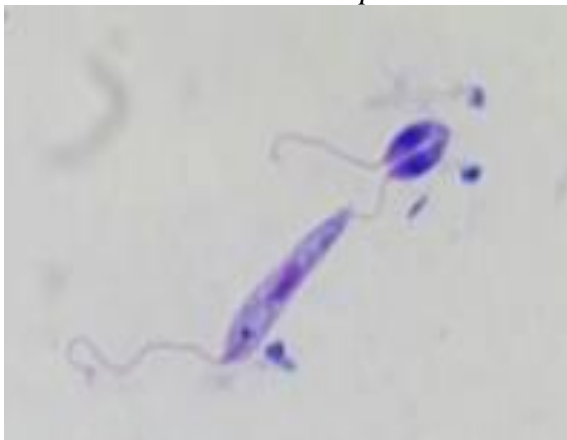
A LV foi descrita inicialmente como doença de ambiente rural e silvestre, mas hoje se encontra em franca expansão no mundo, devido ao desmatamento descontrolado, ao processo migratório constante, ao aumento da densidade do vetor e ao estreito convívio entre o homem e os reservatórios silvestres e domésticos (GONTIJO; MELO, 2004; MACHADO et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2010). O processo migratório e o desmatamento intenso promoveram, no Brasil, a aproximação entre os animais silvestres e os domicílios humanos, o que ocasionam a ligação entre os ciclos parasitários silvestres e domésticos, resultando na adaptação do vetor ao ambiente urbano (FIGUEREIDO et al., 2010).

#### 2.1.1. *Leishmania infantum*

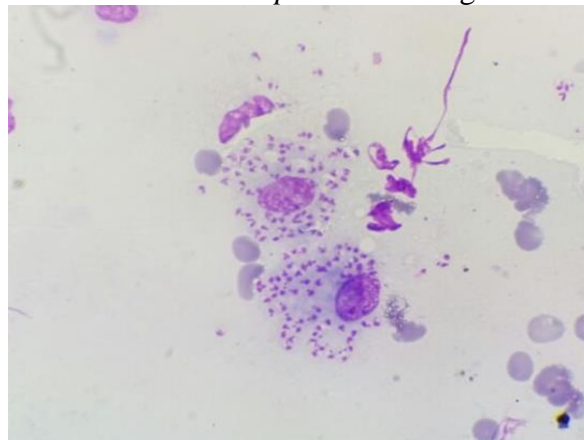
No Brasil, o agente etiológico da LV canina é *Leishmania infantum*, parasito intracelular obrigatório das células do sistema mononuclear fagocitário, que se apresenta na forma flagelada ou promastigota (Figura 1) encontrada no tubo digestivo do vetor e na forma aflagelada ou amastigota (Figura 2) encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (CIARAMELLA; CORONA, 2003; BRASIL, 2006). O protozoário da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae já foi descrito em muitas espécies de mamíferos, como os canídeos silvestres e domésticos, roedores,

marsupiais, gatos domésticos, equinos e o homem (IKEDA-GARCIA; MARCONDES et al., 2007; SILVA, 2007; TASCA et al., 2009).

**Figura 1-** Formas promastigotas da *Leishmania sp.*



**Figura 2-** Formas amastigotas da *Leishmania sp.* em macrófagos



Fonte- Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE-UFBA) (arquivo do estudo)

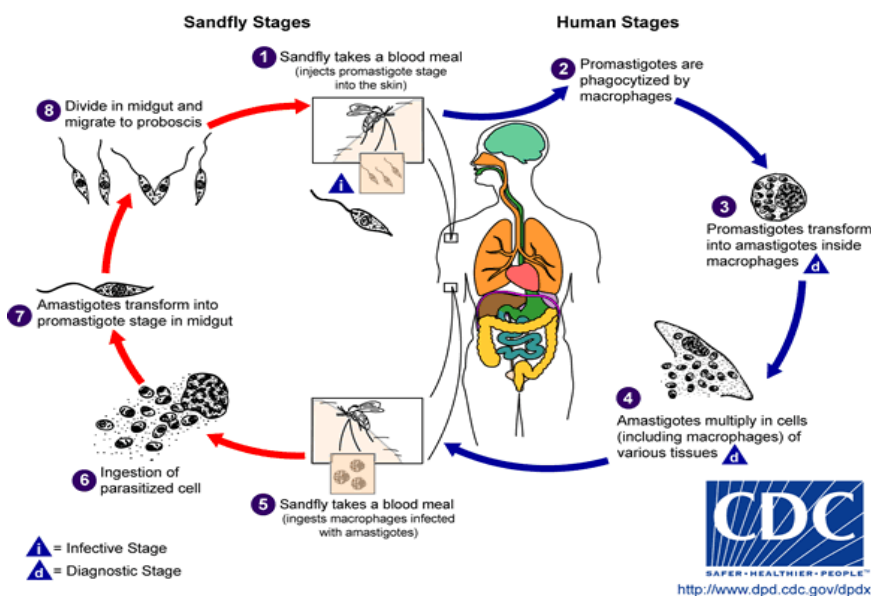
### 2.1.2. Ciclo biológico do parasito

*Leishmania* é transmitida para cães e humanos por flebotomíneos, que atuam como vetores em áreas endêmicas. O principal flebotomíneo vetor da LV canina no Brasil é *Lutzomyia longipalpis*, porém *Lutzomyia cruzi* tem sido incriminado como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul (GALATI et al., 1997; GONTIJO; MELO, 2004). Os flebotomíneos são conhecidos popularmente como tatuquira, mosquito palha, ou birigui, dentre outros nomes. Esses insetos dípteros eram particularmente encontrados em cavernas e fendas de rochas nas matas, mas passaram por adaptação ao ambiente rural e ao ambiente urbano. Atualmente, os flebotomíneos podem ser encontrados próximo aos domicílios humanos, em galinheiros, canis, estábulos e outras construções (GALATI et al., 1997; SOUZA; BORASCHI; NUNES, 2007; BRASIL, 2006).

A fêmea hematófaga (Ordem: díptera, Família: Psychodidae, Subfamília: Phlebotominae) é responsável pela transmissão do parasito aos hospedeiros susceptíveis, e transfere a forma metacíclica infectante do parasito para a derme dos hospedeiros vertebrados no momento da alimentação sanguínea (GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2006). Ao fazer o repasto sanguíneo em mamíferos infectados, as fêmeas, hematófagas, sugam o sangue, ingerindo macrófagos com a forma amastigota de *Leishmania*. Dentro do trato digestivo anterior do vetor, as células sanguíneas se rompem e liberam as formas amastigotas, que sofrem divisão binária e se diferenciam

em formas promastigotas metacíclicas que são as formas infectantes (Figura 3) (IKEDA-GARCIA; MARCONDES et al., 2007; SOUZA; BORASCHI; NUNES 2007; BRASIL, 2006).

**Figura 3-** Ciclo biológico da transmissão da *Leishmania* ao vetor e aos hospedeiros mamíferos

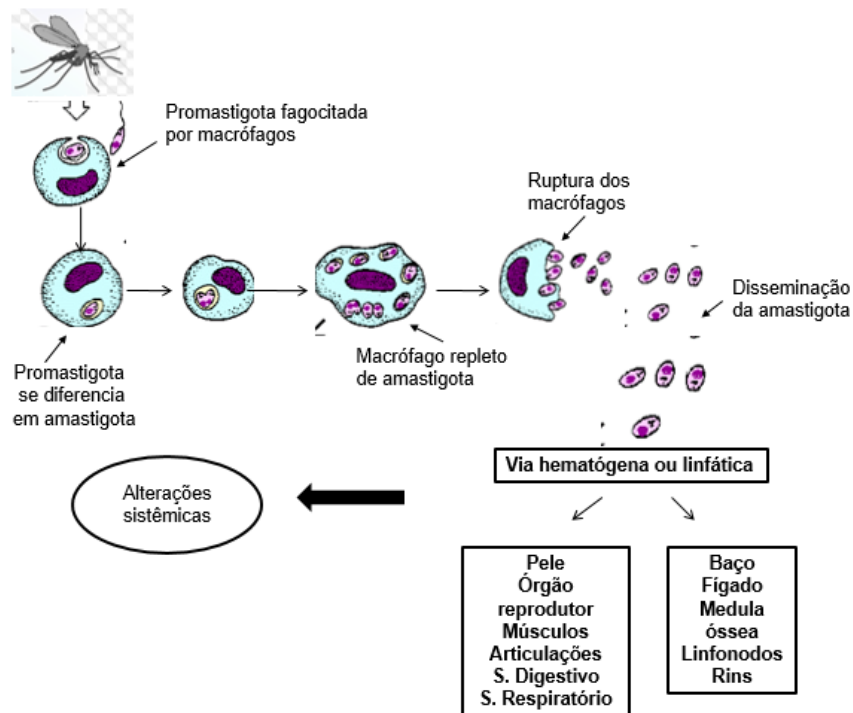


Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/leishmaniasis.htm>

## 2.2. Aspectos fisiopatológicos da infecção por *L. infantum* no cão

No momento de um novo repasto sanguíneo em um cão suscetível, o vetor *L. longipalpis* infectado inocula a forma promastigota metacíclica da *Leishmania* na derme. Na corrente sanguínea, as formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. Dentro dos macrófagos, os parasitos diferenciam-se em formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária, gerando novas amastigotas. Os macrófagos repletos de amastigotas rompem-se, liberando-as para serem fagocitadas por novos macrófagos e assim, a infecção dissemina-se para órgãos linfoides, tais como baço, medula óssea, fígado e outros órgãos pela via hematogênica como pele, músculos e articulações (Figura 4) (PINELLI et al., 1994; MURRAY et al., 2005; BRASIL, 2006; IKEDA-GARCIA; MARCONDES et al., 2007; SILVA, 2007a; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Todo esse processo se dá na forma de infecção crônica (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007).

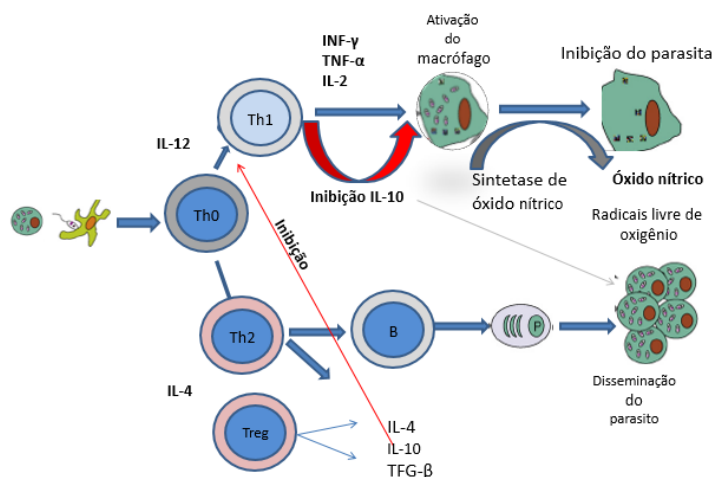
**Figura 4** – Esquema demonstrativo do curso da disseminação da *Leishmania* no organismo do hospedeiro vertebrado. *Leishmania* por meio da via hematogênica ou linfática invade os órgãos e causa alterações sistêmicas.



**Fonte** – Adaptada ([https://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/Is\\_Ic.html](https://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/Is_Ic.html))

No curso da infecção parasitária, o sistema imune, quando competente, controla o número de parasitos presentes no organismo. Se a resposta imune não é competente, além de não impedir o aumento da carga parasitária no cão, pode induzir a doença imunomediada, associada ao parasitismo. Assim, a apresentação da doença vai depender do tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro (PINELLI et al., 1994). A resposta mediada por células Th1 tem como função combater os microrganismos intracelulares, através da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2, as quais promovem aumento da eficiência das células fagocíticas e de linfócitos citotóxicos. Os macrófagos ativados produzem radicais livres dependentes de oxigênio que são tóxicos aos parasitos, e, dessa forma, promovem o controle da infecção. Em contraste, a resposta Th2 induz a produção de citocinas pré-inflamatórias tais como IL-4, IL-5 e a IL-10 e a produção de anticorpos (Figura 5), a IL-10 inibe a atividade microbicida dos macrófagos infectados (PINELLI et al., 1994; ALVAR et al., 2004; IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007; MACHADO et al., 2007; BANETH et al., 2008).

**Figura 5-** Resposta imune do hospedeiro infectado por *Leishmania infantum*.



Fonte: Adaptada (BANETH et al., 2008)

A IL-12 é a principal citocina indutora das células TCD4<sup>+</sup> Th1. A resistência à infecção está associada à ativação dessas células, que irão produzir IFN- $\gamma$  e ativar os macrófagos a destruírem as amastigotas intracelulares. Já a ativação das células Th2 pelo parasito resulta no aumento da sobrevivência do protozoário e agravamento das lesões devido às ações supressivas dessas citocinas nos macrófagos (MACHADO et al., 2007).

A produção exagerada de anticorpos tem pouca efetividade na resposta imune contra o parasito, leva à deposição de imunocomplexos em diferentes tecidos, induzindo alterações inflamatórias (AMUSATEGUI, 1998; IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007; SILVA, 2007a, b). O avanço da infecção vai depender da competência da resposta imune do hospedeiro (ALVAR et al., 2004).

O período de incubação da doença pode variar de 2 a 12 meses para que o cão apresente sinais clínicos. O quadro clínico está associado à imunocompetência do hospedeiro ao parasito, e mais grave será quanto maior for a carga parasitária (FERRER, 1999; IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007; SOLANO-GALLEG0, 2009). Geralmente a doença inicia-se com febre intermitente, linfadenopatia, hipergamaglobulinemia e perda de peso. Podendo ocorrer a cura espontânea ou evoluir até a morte (CIARAMELLA et al., 1997; SILVA, 2007b; BANETH et al., 2008).

A pele é um importante órgão no progresso da infecção, apresenta-se comumente acometida com úlceras crostosas em ponta de orelha, cauda e focinho, descamação furfurácea e alopecia focal ou multifocal (CIARAMELLA et al., 1997;

KRAUSPENHAR, 2007; SILVA, 2007b; BANETH et al., 2008). As úlceras na pele normalmente relacionam-se com a presença direta do parasita ou pode estar atribuída a vasculite devido à deposição de complexos imunes (CIARAMELLA et al., 1997; CIARAMELLA; CORONA, 2003).

As lesões hepáticas são descritas por hipertrofia, inflamação granulomatosa e hiperplasia das células de kúpffer que albergam *Leishmanias*. Nos órgãos linfoides, há reação inflamatória e difusa com macrófagos repletos de parasitos. Ocorre hipertrofia dos linfonodos e esplenomegalia com presença de amastigotas (AMUSATEGUI, 1998; KRAUSPENHAR, 2007; SILVA, 2007b; BANETH et al., 2008). A depender da gravidade da doença, pode ocorrer hipertrofia dos linfonodos poplíteos, mandibulares e cervicais superficiais, sendo o maior envolvimento dos gânglios linfáticos dependentes de lesões próximas aos pontos em que ocorre a drenagem linfática (CIARAMELLA et al., 1997; SILVA, 2007a). Assim como em outros órgãos linfoides, na medula óssea a hiperplasia e hipertrofia das células são características (KRAUSPENHAR et al., 2007; SILVA, 2007b).

Nos rins, observa-se glomerulonefrite membranoproliferativa ou nefrite intersticial devido à deposição de imunocomplexos nos glomérulos, o que leva ao comprometimento da função renal (CIARAMELLA et al., 1997; SILVA, 2007b; BANETH et al., 2008). Na LV canina, a lesão renal é comum, e a insuficiência renal pode ser o único parâmetro exibido pelo animal e leva à morte em poucos dias, se não houver interferência terapêutica (CIARAMELLA et al., 1997; PLEVRAKI et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Esse é um fator de grande relevância quando se investiga a farmacocinética de drogas que possuem eliminação renal.

As lesões oculares, tais como ceratoconjuntivite, blefarite, uveíte, edema de córnea podem estar relacionadas com deposição de imunoclompexos (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; CIARAMELLA; CORONA, 2003). Na ceratoconjuntivite seca, infiltrados inflamatórios situados próximos aos ductos lacrimais podem provocar diminuição da produção de lágrimas (BANETH et al., 2008).

A presença de diarreia crônica com melena pode ser indicativa de lesões no intestino causadas por ulcerações na mucosa intestinal (FERRER, 1999; CIARAMELLA; CORONA, 2003; SILVA, 2007b; NERY et al., 2015).

As alterações articulares e ósseas são encontradas com certa frequência em cães com LV, como também se observa a atrofia muscular, que pode estar associada com a

presença de infiltrados mononucleares contendo formas amastigotas de *Leishmania* (SILVA, 2007b; BANETH et al., 2008).

O quadro clínico varia de acordo com o tempo de diagnóstico da doença (tempo do início da doença), bem como a resposta à terapêutica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011), que costuma ser bastante individualizada em cada animal.

### **2.3. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina**

Diferente do homem, o cão com LV apresenta alterações sistêmicas e de pele (RHALEM et al., 1999; ALMEIDA et al., 2005; KRAUSPENHAR et al., 2007; SILVA, 2007b; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). A infecção por *Leishmania* em humanos leva ao estado de doença crônica visceral, sistêmica, que pode ser fatal se não houver intervenção terapêutica (WHO, 2010).

A doença nos cães manifesta-se por características clínicas variadas e podem ser semelhantes aos achados em outras doenças infecciosas, sistêmicas e auto-imunes (FERRER, 1999; IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007). Os sinais clínicos podem ser inespecíficos, como febre, anemia arregenerativa, perda de peso e caquexia. Os animais com doença em estágios moderados a muito grave podem apresentar linfadenomegalia localizada ou generalizada, lesões dermatológicas (úlceras, dermatite papular, nodular, pustular e alopecia), onicogrifose, lesões oftálmicas, anorexia, epistaxe, hiperglobulinemia, diarreia, hepatoesplenomegalia, falência renal que pode levar a óbito e em alguns casos podem ocorrer distúrbios locomotores e neurológicos (FERRER, 1999; IKEDA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005; AGUIAR et al., 2007; KRAUSPENHAR et al., 2007; SILVA, 2007a,b; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Algumas alterações estão demonstradas na Figura 6.

**Figura 6** - Diferentes alterações dermatológicas em cães causada pela *Leishmania*: A- Lesão ulcerativa interdigital, B- lesão ulcerativa em área de contato no membro anterior; C- Nódulos intradérmicos na face e região interna da orelha; D- Onicogribose; E- Alopecia periocular; F- Vasculite em ponta de orelha.



Fonte – Laboratório de Infectologia Veterinária – (LIVE-UFBA) (arquivo do estudo)

#### 2.4. Diagnóstico da infecção e da doença canina

O guardião de um cão portador de LV, durante a anamnese, em geral relata como queixa principal a apresentação de alterações comportamentais ou corporais no cão, associadas aos sinais físicos sugestivos da doença e histórico de habitação ou estadias do cão em área endêmica para LV. O diagnóstico clínico presuntivo da LV canina torna-se complexo, devido à diversidade de sinais clínicos que o animal pode vir a apresentar, sinais facilmente confundidos ou somados a distúrbios semelhantes, como outras doenças infecciosas, auto-imunes e dermatológicas (FERRER, 1999).

O diagnóstico clínico da LV canina tem como propósito estabelecer os objetivos terapêuticos e o prognóstico. No decorrer do diagnóstico clínico, são realizados anamnese, exame físico e coleta de amostras biológicas para exames de análises laboratoriais. Assim, a partir da suspeita clínica devem ser solicitados exames para



confirmação e diagnóstico diferencial com outras enfermidades como exemplo, erliquiose ou babesiose. O estadiamento clínico do animal é realizado por meio dos sinais clínicos e avaliação dos exames sorológicos, parasitológicos, moleculares, hematológicos, perfil bioquímico, relação proteína/creatinina urinária (UPC) e urinálise (SOLANO-GALLEGO et al., 2009, 2011).

O diagnóstico laboratorial é esclarecedor e fundamental, tanto para confirmação da suspeita, quanto no estabelecimento de doenças concomitantes e prognóstico (AGUIAR et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2008). As principais alterações nas análises laboratoriais encontradas na LV são hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, aumento das enzimas hepáticas, anemia arregenerativa, linfopenia e leucocitose, trombocitopenia, azotemia, proteinúria (IKEDA et al., 2003; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

O diagnóstico diferencial entre infecção por *L. infantum* e outras condições pode ser realizado com a utilização de métodos imunológicos, como os exames sorológicos por meio das técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio de imunoabsorção (ELISA), que indicam evidências de resposta imune humoral, por meio de positividade para imunoglobulina G do cão a antígenos parasitários (FERRER, 1999; BRASIL, 2006).

Os métodos diretos parasitológicos, baseados na citologia aspirativa de linfonodo, baço, medula óssea e/ou *swab* conjuntival para obtenção de amostras de células, associada à realização de esfregaços em lâminas, ao isolamento do parasito em meio de cultura, são capazes de demonstrar a presença do parasito nas células do cão, a depender da técnica pode ser visualizada a forma amastigota ou promastigota (BARROUIN-MELO et al., 2004; MAIA; CAMPINO, 2008). Os métodos moleculares, realizados em amostras de células obtidas também por biopsia aspirativa, incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, são capazes de quantificar e indicar a presença de DNA do parasito em diferentes tecidos no cão, como na medula óssea, aspirado de linfonodo, aspirado esplênico, pele, sangue e fluidos biológicos (MOREIRA et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Para fins de ações de saúde pública, triagem e destinação dos cães positivos no Brasil, atualmente o Ministério da Saúde preconiza como diagnóstico da LV canina os testes imunocromatográfico rápido *Dual Parth Platform* (DPP) para triagem e o ELISA como confirmatório (Nota técnica, nº 01/2011).

Os exames laboratoriais sorológicos ou diretos, ou ainda exames auxiliares por técnicas de imagem, devem ser realizados para afastar a possibilidade de outras

infecções ou condições patológicas, tanto no diagnóstico diferencial quanto na identificação de doenças concomitantes à LV no cão (MAIA; CAMPINO, 2008).

## 2.5. Aspectos do tratamento antiparasitário em cães

Na Europa, o tratamento da LV canina é realizado com diferentes protocolos, cuja escolha depende do estágio clínico-patológico inicial de cada animal. Cães com insuficiência renal têm pior prognóstico quanto à resposta ao tratamento, em comparação àqueles que não têm envolvimento renal ou que apresentam leve proteinúria (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Os critérios farmacológicos para que uma droga seja considerada leishmanicida no tratamento da LV são atuar no metabolismo do parasito, inibindo a sua glicogénólise e a via de oxidação dos ácidos graxos, redução na produção de ATP (AMUSATEGUI, 1998; BRASIL, 2006). Ou ligando-se aos esteróis da membrana da *Leishmania* alterando sua permeabilidade e destruindo-a (BRASIL, 2006; RIBEIRO, 2007). Para uma droga ser considerada leishmanióstática, ela deve agir impedindo a multiplicação da *Leishmania* por bloqueio da síntese de proteínas a partir do RNA (AMUSATEGUI, 1998; GINEL et al., 1998).

A terapia com drogas leishmanicidas na maioria das vezes leva à cura clínica, embora os cães tratados possam continuar a abrigar o parasito e ser infecciosos para o vetor, mas em menor grau do que antes do tratamento (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Dentre as drogas consideradas leishmanicidas no tratamento de cães, incluem-se os antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil glucamina e pelo estibogluconato de sódio), a miltefosina e a anfotericina B (AMUSATEGUI, 1998; CAVALIEIRO et al., 1999; RIBEIRO, 2007; MAIA et al., 2013).

No Brasil, o tratamento do cão não é recomendado pelo Ministério da Saúde, e sim o sacrifício dos cães infectados, com a alegação de que “o cão tratado não deixa de ser um potencial reservatório devido à baixa eficácia dos medicamentos em prevenir ocorrência de recidivas e, há o risco de seleção de *Leishmania* resistente às drogas utilizadas para tratamento humano” (BRASIL, 2006). Com base nessa assertiva, a portaria interministerial Nº 1.426, de 11 de julho de 2008 proíbe, em todo território nacional, o tratamento de cães infectados ou doentes com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O

MAPA ainda recomenda que drogas de uso não-humano sejam desenvolvidas e propostas para o tratamento exclusivo da LV canina (BRASIL, 2006).

O alopurinol é uma droga classificada como leishmanioestática no tratamento da LV em cães (AMUSATEGUI, 1998; RIBEIRO, 2007). Na Europa, o alopurinol é incluído dentre as bases farmacológicas utilizadas no tratamento antiparasitário da LV canina e é citada por diversos pesquisadores, comumente em combinação com os antimoniais pentavalentes, e outras drogas anti-*Leishmania* e/ou imunomoduladoras, ou ainda como medicação única (AMUSATEGUI, 1998; GINEL et al., 1998; REGUERA et al., 2016). O fármaco tem boa aceitação pelos guardiões dos cães, devido à fácil administração, pela via oral, ao baixo custo, e à disponibilidade comercial (AMUSATEGUI, 1998; GINEL et al., 1998; CAVALIEIRO et al., 1999; NOLI; AUXILIA, 2005).

Alguns autores propõem o uso prolongado do alopurinol, após o uso concomitante com drogas leishmanicidas, para manter a carga parasitária sob controle, evitando recidivas clínicas (FERRER, 1995; GINEL et al., 1998). Quando usado como primeira e única droga, o alopurinol mostrou ser ineficaz no tratamento tanto da LV, quanto da leishmaniose cutânea em cães, no entanto, quando associado a outras drogas, mostra um bom sinergismo (GINEL et al., 1998; DENEROLLE; BOURDOISEAU, 1999; LIMA et al., 2007). Os protocolos mais utilizados na Europa associam antimoniais pentavalentes e o alopurinol (FERRER et al. 1995; RIBEIRO, 2007). O protocolo baseado na associação do antimoniato de meglumina com alopurinol é considerado o mais eficaz, e é tido como primeira opção na terapia da LV canina (DENEROLLE; BORDOISEAU, 1999).

Um estudo recente desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE - Infectologia Veterinária/CNPq) demonstrou que cães tratados com protocolo poli-quimioterápico, que incluiu o alopurinol, apresentaram melhora clínica associada com redução da carga parasitária esplênica e resultados negativos no xenodiagnóstico (NERY, 2015).

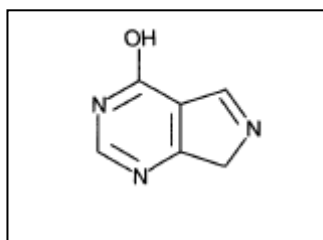
O alopurinol não é utilizado para o tratamento da LV humana.

## **2.6. Aspectos farmacológicos do alopurinol**

O alopurinol (Zyloric®, Wellcome) (1H-pirazolo (3,4-d) pirimidin-4-ol) é uma base de oxipurina (Figura 7), que foi sintetizada pela primeira vez na década de 1950

por George Hitchings e Gertrude Elion em Nova York com o objetivo de aumentar a eficácia de drogas antineoplásicas, porém mais tarde esses autores perceberam que a droga não tinha ação antineoplásica, mas era um forte inibidor da enzima xantina oxidase (DAY et al., 1994; GRAHAM et al., 1996). O fármaco é eficaz no tratamento da hiperuricemia em humanos, reduzindo a produção de urato (GRAHAM et al., 1996; WRIGHT et al., 2013).

**Figura 7:** Estrutura do alopurinol.



**Fonte:** Adaptada de DAY et al., 1994.

O alopurinol é comumente usado em humanos para o tratamento profilático da gota, uma patologia caracterizada por aumento de ácido úrico no sangue. O excesso do ácido úrico é associado à deposição de cristais nos tecidos e principalmente nas articulações provocando artrite aguda (DAY et al., 1994; WRIGHT et al., 2013). Na medicina humana, o alopurinol é também citado em outras aplicações, como na prevenção de formação de cálculos de urato no trato urinário (DAY et al., 1994; 2007), parece ser adequado o uso do alopurinol para diminuir alterações morfológicas durante a isquemia-reperusão em jejuno em modelo canino (BRATH et al., 2011), na terapêutica de doenças causadas por protozoários, como leishmaniose cutânea e tripanossomíase, pois inibe o crescimento de *Leishmania* spp. *in vitro*, o que foi considerado um grande avanço clínico. Determinados análogos de purina são metabolizados pelos parasitos a nucleotídeos aminados para os análogos de nucleotídeos de adenina. Estes interrompem a síntese de proteínas e causam a repartição de RNA (MARR et al., 1991), além do uso no controle de pacientes com epilepsia refratária a drogas antiepiléticas convencionais, pois reduziu significativamente as convulsões generalizadas e as crises secundárias (ZAGNONI et al., 1994).

Na medicina veterinária, a droga é citada para o controle de hiperuricosúria em Dálmatas, que apresentam predisposição para desenvolver altas concentrações de ácido

úrico. Cães dessa raça excretam ácido úrico em forma de sal, urato de amônia, substância que possui pouca solubilidade, favorecendo a formação de cristais de urato, conseqüentemente urolitíase (LING et al., 1997). O uso do alopurinol também é bastante citado nos protocolos de tratamento de cães com leishmaniose visceral (GINEL et al., 1998; CAVALIEIRO et al., 1999; PLEVRAKI et al., 2006; NERY, 2015; REGUEIRA et al., 2016).

Em cães, as doses utilizadas para o tratamento de hiperuricosúria variam de 10 a 15mg/kg, uma ou duas vezes ao dia (NELSON; COUTO, 2010), 15 a 20 mg/kg duas a três vezes ao dia (ANDRADE, 2008), para prevenir a formação de cálculos de urato de amônia (LING et al., 1997). Um efeito indesejável do alopurinol é a formação de cálculos de xantina, sendo indicada dieta livre de purina - dietas pobres em proteína – nos cães sob tratamento. No entanto, os benefícios do alopurinol podem ser mais importantes do que os riscos da sua utilização em cães que apresentam diversos episódios de urolitíase por urato (ANDRADE, 2008; NELSON; COUTO, 2010). Devido à excreção renal da droga, em pacientes que apresentam disfunção renal, a dose pode ser ajustada em 20% a 30% menor que a dose normal, porque a eliminação torna-se mais lenta (ANDRADE, 2008).

### **2.6.1. Farmacocinética do alopurinol**

Em humanos, o alopurinol é rapidamente absorvido após administração por via oral, e apresenta biodisponibilidade em cerca de 70-80% (MURREL; RAPEPORT, 1986; GUERRA et al., 2001). As concentrações plasmáticas máximas são obtidas em torno de 30 minutos a 1 hora após ingestão, e cerca de 60-70% de alopurinol são convertidos rapidamente pela xantina oxidase para o metabólito ativo, oxipurinol (APPELBAUM et al., 1982; GUERRA et al., 2001). A ligação do alopurinol e oxipurinol às proteínas plasmáticas é insignificante, no entanto, não se espera que variações na ligação às proteínas altere significativamente a concentração plasmática do mesmo (MURREL; RAPEPORT, 1986; SANDOZ, 2014). A concentração de alopurinol nos animais são mais elevadas no sangue, fígado, intestino e coração e em menor concentração no pulmão e cérebro (ELION et al., 1966). O alopurinol tem meia-vida de eliminação de 40 minutos a 2 horas (GRAHAM et al., 1996; GUERRA et al., 2001; WRIGHT et al., 2013). O oxipurinol pode ser detectado no plasma dentro de 15 a 20 minutos após administração oral do alopurinol, e apresenta uma meia-vida mais longa, que varia entre 13-30 horas em humanos com função renal normal (Figura 8). O

alopurinol é excretado principalmente por via hepática e o oxipurinol é eliminado principalmente por via renal (ELION et al., 1966; APPELBAUM et al., 1982; MURREL; RAPEPORT, 1986; DAY et al., 2007). Uma dose de 100mg de alopurinol por via oral gera 90mg de oxipurinol (DAY et al., 2007).

Em cães, poucos estudos reportam a farmacocinética do alopurinol, mas não há dados disponíveis na literatura sobre o metabólito ativo – oxipurinol. Em cães Dálmatas saudáveis, a cinética do alopurinol apresentou-se como cinética de 1ª ordem (quando a concentração do fármaco no plasma é proporcional à dose) e modelo monocompartimental (quando o fármaco é distribuído no organismo como um todo), por administração oral ou endovenosa (LING et al., 1997).

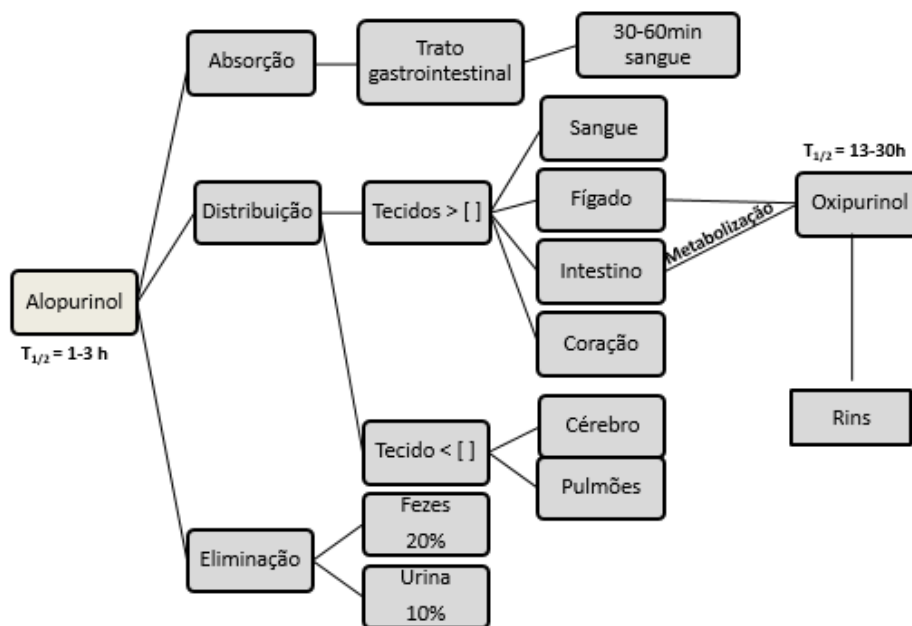
A farmacocinética do alopurinol no tratamento em cães com hiperuricosúria, pela via de administração oral na posologia de 10mg/Kg da droga, apresentou pequenas variações quando comparadas à via endovenosa na dose de 6mg/kg, mas os autores associaram as diferenças ao processo de hiperuricosúria dos cães, e não à dose (LING et al., 1997). A constante da velocidade de absorção do alopurinol ( $K_a=1,06\pm 0,13/\text{hora}$ ) apresentou um pico de concentração plasmática de  $C_{\max}=6,43\pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ , em um tempo máximo de  $T_{\max}= 1,9$  horas. O volume de distribuição aparente ( $V_d/F = 1,17\pm 0,07 \text{ L/Kg}$ ) mostrou que o fármaco é bem distribuído do plasma para o sistema biológico (LING et al., 1997).

Quanto ao metabolismo, o alopurinol é convertido rapidamente pela xantina oxidase para o metabólito ativo, oxipurinol, via oxidação (GUERRA et al., 2001; DAY et al., 2007). Tanto o alopurinol quanto o oxipurinol são excretados principalmente pela via renal – como no homem, e o *clearance* na administração endovenosa foi de  $0,36\pm 0,03 \text{ L/Kg.h}$  (LING et al., 1997), sendo 10% eliminado na forma inalterada e 20% pelas fezes (APPELBAUM et al., 1982; SANDOZ, 2014).

A terapia com alopurinol é associada ao aumento das concentrações de hipoxantina e xantina na urina e plasma, e diminuição das concentrações plasmáticas de ácido úrico. Os principais efeitos são mediados pelo metabólito ativo do alopurinol, o oxipurinol, que se encontra em maior concentração sérica (MURREL; RAPEPORT, 1986).

Até onde alcançou nossa revisão de literatura, não há estudos sobre a farmacocinética do alopurinol em cães portadores de LV naturalmente adquirida em tratamento no regime de dose múltipla, assim como não há estudos sobre a farmacocinética de oxipurinol em cães.

**Figura 8-** Fluxograma demonstrativo da farmacocinética do alopurinol em humanos.

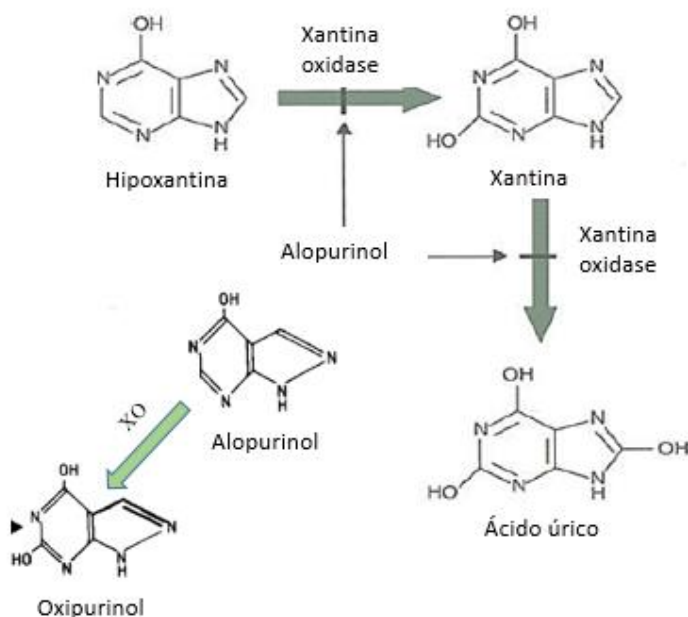


Fonte – Adaptado de Murrel; Rapeport, (1986); Day et al., (2007)

### 2.6.2. Aspectos da farmacodinâmica do alopurinol

O mecanismo de ação do alopurinol se dá pela inibição da enzima xantina oxidase, enzima esta que catalisa a formação de hipoxantina em xantina e xantina em ácido úrico (Figura 9) (MURREL; RAPEPORT, 1986; DAY et al., 1994).

**Figura 9** - Mecanismo de ação do alopurinol sobre a enzima xantina oxidase



Fonte – Adaptação de Murrel; Rapeport, (1986) e Day et al., (1994)

A xantina é um subproduto do metabolismo das purinas, e por ser a menos solúvel das purinas excretadas na urina, seu excesso pode levar à formação de cálculos de xantina em cães que possuem deficiência da enzima xantina oxidase (ARIZA, 2012). O tratamento com alopurinol tem sido associado a xantinúria em cães, uma vez que a droga se liga à xantina oxidase, inibindo sua ação (LING et al., 1997). A terapia com alopurinol reduz a concentração de ácido úrico na urina, mas aumenta a concentração de xantina. A xantinúria aumenta de forma proporcional à quantidade de purinas na dieta, à dose e à frequência de administração do alopurinol (ARIZA, 2012).

No cão, a xantinúria e formação de urólitos de xantina são efeitos adversos supostamente incomuns, mas em pacientes renais humanos, o alopurinol pode deteriorar ainda mais a capacidade funcional renal e até mesmo causar nefrite intersticial aguda (PLEVRAKI et al., 2006). Apesar disso, o alopurinol apresenta baixa toxicidade, mas já foram relatados febre, leucopenia e alguns distúrbios cutâneos, digestivos e elevações de enzimas hepáticas que são geralmente raros e de baixa intensidade (DAY et al., 1994; AMUSATEGUI, 1998; RIBEIRO et al., 2007).

A litíase formada por cálculos de xantina é uma enfermidade pouco frequente tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. A causa pode ser primária (congenita) ou secundária ao tratamento com alopurinol (ORTEGA, 2008). Em ambas as formas ocorrem a diminuição da formação de ácido úrico, o que resulta no aumento da formação de hipoxantina e xantina, sendo a xantina menos solúvel na urina (LING et al., 1997; TORRES et al., 2016).

No entanto, há várias citações sobre o aparecimento de cristais ou urólitos de xantina secundários a uma terapêutica longa com alopurinol em cães (PLEVRAKI et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; TORRES et al., 2016).

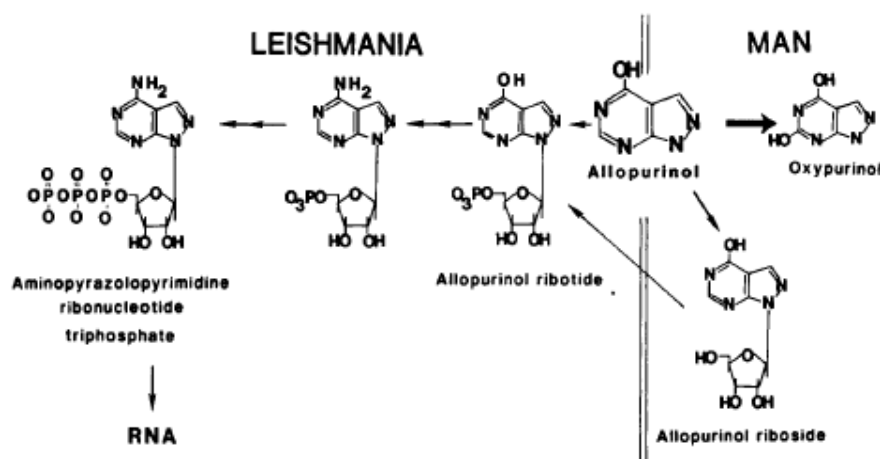
### **2.6.3. Ação da droga na *Leishmania***

A atividade leismaniostática do alopurinol foi demonstrada em *L. brasiliensis* (PFALLER; MARR, 1974) e *L. infantum* (KAMAU et al., 2001) *in vitro*. A atividade da xantina oxidase na *Leishmania* foi avaliada para investigar o mecanismo de ação do fármaco, porém nenhuma atividade foi observada (PFALLER; MARR, 1974). Os protozoários são considerados organismos que não têm a capacidade de sintetizar purinas, um composto orgânico necessário ao seu crescimento, portanto, a aquisição de purinas dos hospedeiros é uma necessidade essencial para o crescimento e sobrevivência desses parasitos (AMUSATEGUI, 1998; GINEL et al., 1998). Assim, no



organismo do hospedeiro, o alopurinol é captado pelo parasito por ser análogo das purinas. Na célula parasitária, o alopurinol interfere na ação da enzima envolvida na síntese de RNA, como a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, bloqueando o crescimento do parasito, que depende do hospedeiro como fonte de purinas para sobreviver (PFALLER; MARR, 1974; AMUSATEGUI, 1998; GINEL et al., 1998). Acredita-se que a ação do alopurinol em inibir o crescimento da *Leishmania* está relacionada com a formação de ribonucleotídeo alopurinol, pela fosforibosiltransferase (MARR et al., 1978; PFALLER; MARR, 1974; ELION, 1993; AMUSATEGUI, 1998). O ribonucleotídeo do alopurinol subsequentemente é convertido pela adenilosuccinato sintetase em um análogo de AMP, e posteriormente fosforilado ao análogo de ATP (MARR et al., 1978; SHAPIRO et al., 1991; MARTINEZ; MARR, 1992; MADDISSON, 2010). O nucleotídeo aminopirazolopirimidina resultante é incorporado ao RNA do parasito causando degeneração do RNAm, inibição da síntese de proteínas e, como consequência, degradação dos parasitos (Figura 10) (SHAPIRO et al., 1991; ELION, 1993; AMUSATEGUI, 1998; GINEL et al., 1998; MADDISSON, 2010). O efeito leishmaniostático do oxipurinol foi também demonstrado na *L. donovani in vitro* (MARR; BERENS, 1977).

**Figura 10-** Metabolismo do alopurinol em humanos e na *Leishmania*



**Fonte:** Shapiro et al., (1991)

Assim, o fármaco incorpora-se no RNA do parasito, promovendo uma transdução proteica defeituosa, e, com isso, interrompe a síntese de RNA levando-o a alterações estruturais (MARTINEZ; MARR, 1992; CAVALIERO et al., 1999).

### **3. HIPÓTESE DO TRABALHO**

A administração do alopurinol em humanos é realizada uma vez ao dia, pois o seu metabólito (oxipurinol) possui tempo de vida longo. Como há semelhanças entre os aspectos farmacocinéticos em humanos e cães saudáveis, acredita-se que nos cães com leishmaniose seja também possível uma administração diária que atinja o nível de concentração plasmática ideal, dentro do estado de equilíbrio, para controlar a multiplicação da *Leishmania*, sem necessitar realizar a posologia de duas doses diárias.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar as concentrações e determinar a farmacocinética do alopurinol e oxipurinol em cães com leishmaniose visceral naturalmente adquirida e em tratamento com doses múltiplas.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Avaliar as análises laboratoriais dos cães em tratamento (hemograma, bioquímica sérica, relação proteína / creatinina urinária e urinálise).
  
- Avaliar os parâmetros farmacocinéticos do alopurinol e oxipurinol em amostras de plasma e urina de cães em tratamento para leishmaniose visceral.
  
- Avaliar o comportamento do fármaco administrado na dose de 10 mg/kg, indicada na literatura para o tratamento de cães com LV

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Protocolo experimental e aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (CEUA), sob o protocolo número 034/2016, e realizado no Hospital-Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEV-UFBA) no setor de Clínica Médica de Pequenos Animais.

Foram avaliados 11 (onze) cães domésticos, infectados naturalmente com *Leishmania infantum*, em tratamento contínuo com alopurinol em diferentes tempos de uso. Os cães estudados foram todos machos e apresentavam diferentes pesos, idades e raças.

A infecção por *L. infantum* foi diagnosticada por métodos sorológicos (ELISA e RIFI) e parasitológicos (citologia aspirativa de medula óssea e/ou linfonodo, cultivo). A partir da confirmação da infecção, os cães foram submetidos ao protocolo poliquimioterápico, inicialmente à base de associação de cetoconazol, metronidazol e prednisona, durante 40 dias. A partir do 41º dia, os cães passaram a receber alopurinol a 10mg/kg de 12 em 12 horas, a ser ministrado por um ano em uso contínuo. Todos os cães avaliados no presente estudo se encontravam na fase de uso contínuo do alopurinol em tempos de tratamento que variaram de animal para animal, sendo no mínimo após 30 dias de início de uso da droga, ou seja, todas coletas de amostra foram feitas no estado de equilíbrio.

Como critérios de inclusão, os cães deveriam ser naturalmente infectados por *L. infantum*, e fazer uso de dose múltipla de alopurinol na dose de 10mg/kg/duas vezes ao dia. Todos os cães deveriam ser machos, para facilitar o acesso à obtenção de urina. Os critérios de exclusão foram: apresentar doenças concomitantes à LV e/ou fazer uso de outro tipo de medicação além do alopurinol.

#### 5.1.1. Avaliação clínica dos cães

O procedimento foi realizado no setor de Clínica Médica de Pequenos Animais do HOSPMEV-UFBA. No primeiro momento os animais foram avaliados clinicamente e seus dados catalogados individualmente. A avaliação constituiu na anamnese e exame físico. Foram avaliados escore corporal, estado de hidratação, aspecto da pele e das mucosas, tempo de preenchimento capilar (TPC), frequência cardíaca (FC), frequência

respiratória (FR), palpação abdominal, temperatura retal (TR) e palpação dos linfonodos superficiais.

### **5.1.2. Procedimento das coletas de sangue e urina**

Nos animais em jejum de 8 horas, foram coletados por venopunção 10mL de sangue da veia jugular, com seringa de 10mL e agulha 25x7mm. As amostras foram colocadas em tubos com anticoagulante ácido etileno diaminotetracético (EDTA) e tubos sem anticoagulante. Foram coletados 10mL de urina por meio de sonda uretral proporcional ao tamanho do cão. As amostras de sangue para hemograma e avaliação da bioquímica sérica, assim como a amostra de urina, foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) credenciado.

Os exames de bioquímica do soro dos cães incluíram marcadores de integridade e função hepática pela dosagem da alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA); quantificação das proteínas plasmática total (PPT) a albumina e globulinas e avaliada a razão albumina: globulinas. A avaliação das funções renais incluiu a mensuração de ureia e creatinina no soro, e na amostra de urina foram realizadas urinálise e mensuração da proteína urinária (PU), creatinina urinária (CU) e relação proteína/creatinina urinária (UPC).

Para avaliação da concentração plasmática do fármaco, em cada cão foi realizada tricotomia e antissepsia com clorexidine 2% em terço medial do membro anterior direito (veia cefálica). Em seguida, o vaso foi cateterizado em sistema acoplado a uma torneira de 3 vias e bandagem com esparadrapo (fita adesiva). Cada cão foi observado por um período de 12 horas. A coleta foi feita garantindo as concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio, ou seja, primeira coleta pelo menos 15 horas após a primeira dose. Foram coletados 5 mL de sangue e colocados em tubos com heparina sódica (5.000U.I./mL/Blau farmacêutica S.A) para posterior processamento e separação do plasma no tempo zero (T0). Em seguida foram administrados 5 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, para lavagem do acesso, além de 1 mL da solução heparinizada, na diluição de 0,1 mL de heparina sódica para 9,9 mL de solução de NaCl a 0,9%. Essa solução teve por finalidade evitar a coagulação do sangue no acesso venoso. Antes de cada etapa, recolheu-se 1 mL de sangue, que foi desprezado.

Após a coleta do tempo zero (T0) foi administrado o alopurinol por via oral na dose de 10mg/Kg por animal, e os sucessivos tempos das coletas foram estabelecidos aos 15; 30 minutos; 1h; 1,5h; 2h; 2,5h; 3h; 4h; 5h; 7h; 10h e 12 h após a administração

do fármaco em todos os animais. As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm (402 x g) a 15°C durante 5 minutos para separação do plasma. Todos os plasmas foram armazenados em tubos tipos criogênicos (KASVI®, EUA) e acondicionados em freezer a - 20 °C, até sua análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para coleta das amostras de urina, primeiramente foi realizada a antisepsia do prepúcio com clorexidine a 2%. Em seguida a sonda foi introduzida pela uretra até a bexiga de onde foi aspirada uma amostra para análise de 14mL de urina e posterior esvaziamento da bexiga nos tempos 0-3 h; 3-6 h; 6-9 h; 10-12 h após administração do fármaco por via oral. O volume total coletado foi anotado e 15 mL de urina foram armazenadas em tubos cônicos do tipo Falcon (GREINER®, EUA), identificados com o nome do cão, data e tempo de coleta, e acondicionados em freezer a - 20°C, até a realização da mensuração.

Durante o tempo de avaliação de 12 horas, os cães receberam alimento em horário habitual e ingestão e água *ad libitum*. Após as 12 horas do experimento, os cães receberam a segunda dose do alopurinol e foram liberados para a sua residência.

## **5.2. Padronização do método de HPLC-UV para dosagem de alopurinol e oxipurinol no plasma canino**

### **5.2.1. Soluções padrão e reagentes**

O alopurinol (European Pharmacopoeia Reference Standard) 99,8% - Allopurinol CRS e o metabólito oxipurinol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 98,4% (HPLC) foram conseguidos por meio da verba do projeto PRONEM. Os solventes Acetonitrila (J.T. Backer, Mexico City, Mexico), Ácido Fórmico 88% (J.T. Backer, Mexico City, Mexico), Hidróxido de Sódio (NaOH) ACS (J.T. Backer, Mexico City, Mexico), foram grau HPLC.

Toda água utilizada para execução deste experimento foi obtida em sistema de purificação Synergy® UV (Millipore, Molsheim, France).

A solução estoque do alopurinol e oxipurinol foram preparadas em Hidróxido de sódio (NaOH) 1mM, na concentração de 2mg/5ml (400µg/mL). As soluções de uso tanto do alopurinol quanto do seu metabólito o oxipurinol foram preparadas nas concentrações 0,4; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 20,0; 80,0 µg/mL de água. E a solução estoque do

Aciclovir foi preparada em água na concentração de 2mg/5mL (400µg/mL). A solução de uso foi preparada na concentração de 40,0 µg/mL.

O fármaco usado como padrão interno (Aciclovir) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). E como padrão interno secundário o Aciclovir foi gentilmente cedido pela Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

### **5.2.2. Análise Cromatográfica**

A análise do alopurinol e oxipurinol foi realizada por HPLC-UV (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta), constituído por bomba de alta pressão LC20AD e forno para acondicionamento de coluna CTO – 10ASvp, provenientes da Shimadzu (Tóquio, Japão).

O alopurinol e seu metabólito o oxipurinol foram separados em uma coluna LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5 µm) (Merck, Darmstadt, Germany) e usando pré-coluna LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5 µm) (Merck, Darmstadt, Germany). A temperatura do forno foi de 25°C e do amostrador automático de 12°C. A fase móvel foi composta por uma mistura de água, 0,1% de ácido fórmico (88%) e 0,25% de acetonitrila. O LC-UV operou em uma vazão de 0,7mL/min.

A detecção por UV foi realizada em um comprimento de onda de 254 nm.

### **5.2.3. Procedimento de preparo das amostras**

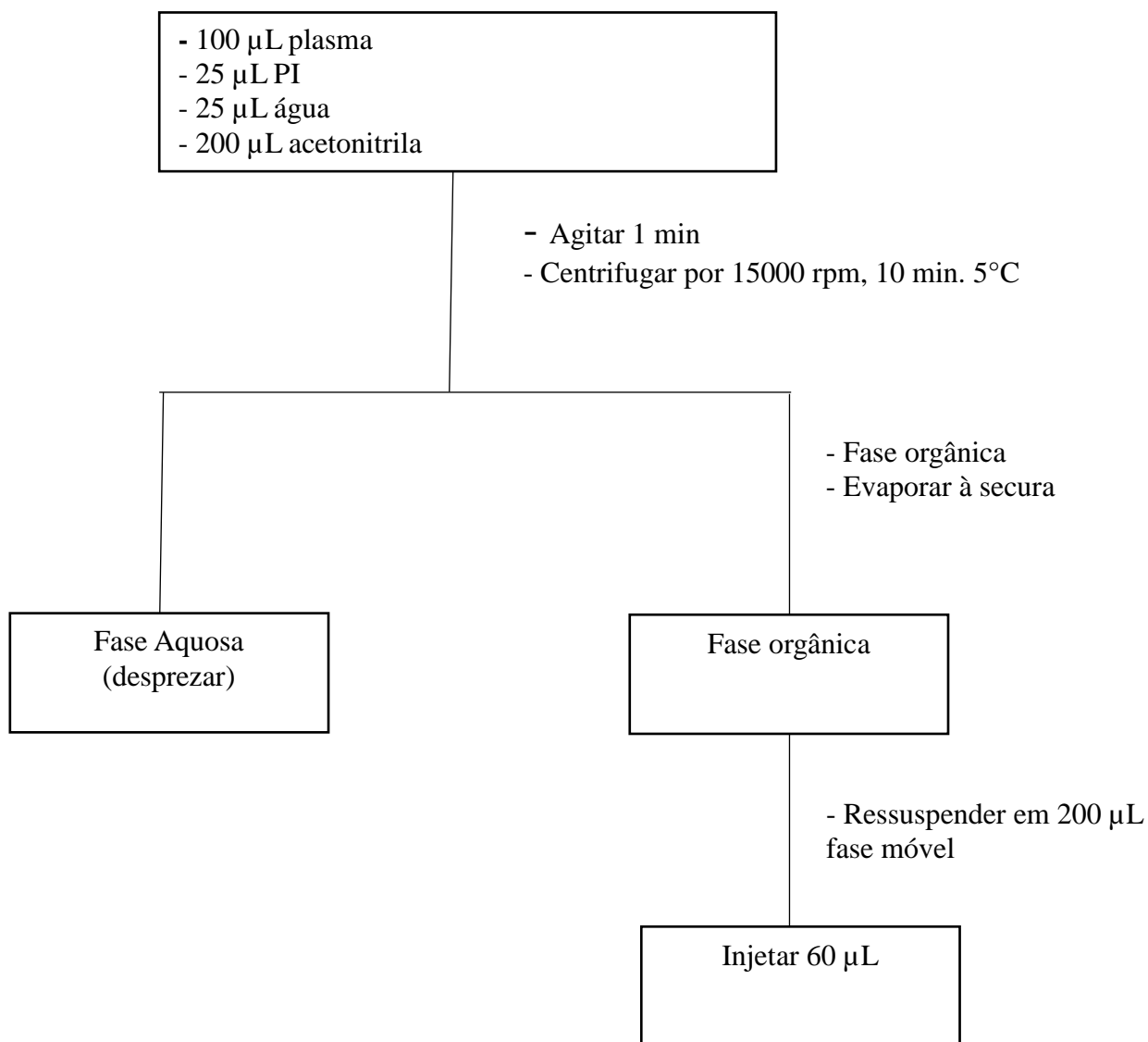
As amostras de plasma branco foram obtidas de cães que não faziam uso de alopurinol e não apresentavam doenças (cães saudáveis), atendidos no Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Para preparar a curva de calibração foram acrescentadas aos 100 µL de plasma branco, solução padrão de alopurinol (25 µL) e oxipurinol (25 µL), nas seguintes concentrações 0,4; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 20,0; 80,0 µg/mL de água. Em seguida foi adicionado 25 µL do padrão interno (PI) aciclovir. Foram adicionados 200µL de acetonitrila (solvente de extração) e agitados no mixer por 1 minuto. Após descanso de 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se a 15.000 rpm (21.500g) por 10 minutos à 5°C. A fase orgânica foi separada, seca e ressuspendida em 200µL de fase móvel para injetar 60µL no HPLC.

No preparo das amostras usou-se 100 µL de plasma dos animais acrescido de 25 µL do padrão interno (PI) aciclovir e 25 µL de água. Foi adicionado 200µL de acetonitrila (solvente de extração) e agitados no mixer por 1 minuto. Após descanso de

10 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se a 15.000 rpm (21.500g) por 10 minutos à 5°C. A fase orgânica foi separada, seca e ressuspensa em 200µL de fase móvel para injetar 60µL no HPLC.

O processo de extração das amostras encontra-se descrito na **Figura 11**.



**Figura 11:** Procedimento de extração líquido-líquido do alopurinol e oxipurinol em plasma canino.

### 5.3. Validação do método HPLC-UV

O procedimento padronizado para análise do alopurinol e seu metabólito em plasma de cão foi validado conforme as indicações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução RDC nº27, 17 de maio de 2012) para a validação de métodos bioanálíticos.

Para a construção das curvas de calibração utilizou-se alíquotas de 100 µL de plasma branco de cães (animais não faziam uso de alopurinol) enriquecidas com 25 µL da solução padrão, 25 µL de padrão interno (PI) e 200 µL de acetronitrila. As amostras foram analisadas como descrito acima. As curvas de calibração foram construídas nos intervalos de 0,4 – 80 µg/mL de cada solução (alopurinol e oxipurinol).

Os pontos denominados como controle de qualidade baixo, médio e alto segundo pedido pela RDC em questão foram 0,25 µg/mL, 10,0 µg/mL e 16,0 µg/mL.

#### 5.3.1. Recuperação

A recuperação do alopurinol e do oxipurinol foi avaliada em triplicata nas concentrações de 0,25 µg/mL (n=5) e 16,0 µg/mL (n=5) de plasma respectivamente. E o aciclovir na concentração de 40,0 µg/mL (n=10) da solução, seguindo o protocolo descrito no item 1.3. As áreas dos picos provenientes das amostras extraídas foram comparadas com as áreas obtidas na análise de soluções padrão.

#### 5.3.2. Limite de quantificação e linearidade

O limite de detecção foi determinado como a menor concentração quantificada do alopurinol e oxipurinol com precisão e exatidão inferior a 20%. As amostras de plasma foram avaliadas em quintuplicatas enriquecidas com alopurinol e oxipurinol na concentração de 0,1 µg/mL cada.

A linearidade foi verificada nas concentrações de 0,1 – 20,0 µg/mL de plasma tanto para o alopurinol quanto para oxipurinol sendo testado oito diferentes concentrações em triplicata.

#### 5.3.3. Precisão e exatidão

Analisou-se a precisão e exatidão nas concentrações de 0,1; 0,25; 10,0; 16,0 µg/mL para o alopurinol e seu metabólito o oxipurinol.

Na análise da precisão intracorridas foram avaliadas 4 preparações de diferentes concentrações e utilizou-se 5 alíquotas de cada amostra por meio de uma única curva de



calibração. O coeficiente de variação (CV) dos dados alcançados deve ser inferior a 15%, para que o método possa ser referido como preciso.

E para a análise da precisão intercorridas avaliou-se 4 preparações de concentrações independentes utilizando 5 alíquotas de cada amostra durante 3 dias sucessivos. A avaliação da precisão intercorridas foi realizada por meio do coeficiente de variação dos valores adquiridos.

Para a análise da exatidão intra e intercorridas utilizou-se os resultados experimentais obtidos na precisão. A exatidão é expressa pelo erro padrão (EPR) e não se admite valor superior a  $\pm 15\%$  do valor nominal.

#### **5.4. Estabilidade**

Avaliou-se a estabilidade do alopurinol e oxipurinol nas concentrações de 0,25 e 16,0  $\mu\text{g/mL}$  de plasma.

Para verificação da estabilidade as amostras passaram por um processo de congelamento e descongelamento, de estabilidade de curta duração e pós-processamento.

Para avaliar a estabilidade de congelamento e descongelamento as amostras em triplicata foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e após 24 horas foram descongeladas e depois novamente congeladas por 12 horas. Este ciclo foi repetido por mais duas vezes e realizada a verificação do fármaco e metabólito.

A avaliação da estabilidade de curta duração foi realizada nas mesmas concentrações citadas previamente para o alopurinol e oxipurinol utilizando amostras de plasma em triplicata, mantidas a temperatura ( $25^{\circ}\text{C}$ ) ambiente por 4 horas para depois serem analisadas.

E para avaliar a estabilidade pós-processamento as amostras após extração foram mantidas a  $12^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas tempo este que compreende o término de preparo da amostra até o final da corrida analítica.

#### **5.5. Análise Farmacocinética e Estatística**

A farmacocinética do alopurinol e seu metabólito oxipurinol é avaliada empregando modelo não-compartimentais e cinética de primeira ordem. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas obtidas em função dos diferentes tempos de coleta, empregando o programa WinNonlin, versão 4.0

(Pharsight Corp., Mountain View, EUA). A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de zero a infinito ( $AUC^{0-\infty}$ ) foi calculada pelo método dos trapézóides com extrapolação para o infinito. O clearance total (Cl) foi obtido por meio da equação  $Cl = Dose/AUC^{0-\infty}$ . As constantes de velocidade de distribuição ( $\alpha$ ) e de eliminação ( $\beta$ ) são estimadas pela equação  $0,693/t_{1/2}$ .

Valores médios e desvio padrão foram utilizados para apresentar os resultados. A análise estatística dos dados de patologia clínica foi realizada de forma descritiva utilizando o programa Excel 2016.

## 6. RESULTADOS

A caracterização dos cães incluiu raça, idade, peso, tempo de diagnóstico, tempo de uso do alopurinol e estadiamento clínico da doença segundo método de classificação descrito por Solano-Gallego et al., (2009). Todos esses dados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Caracterização dos cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* em uso de alopurinol.

Animal	Raça	Idade	Peso	Tempo diagnóstico	Tempo alopurinol	Estadiamento *
Cão 1	Labrador	4a	36kg	2 anos	1 a e 11m	Estágio II DM
Cão 2	Rottweiler	8a	45kg	4a e 3m	3a e 11m	Estágio II DM
Cão 3	SRD	3a	23,8kg	1a e 6m	5 meses	Estágio II DM
Cão 4	SRD	4a	11,3kg	7 meses	6 meses	Estágio I DL
Cão 5	SRD	4a	23,4kg	11 meses	10 meses	Estágio I DL
Cão 6	Cane Corso	3a 8m	42kg	1a e 10 m	1a e 9m	Estágio II DM
Cão 7	SRD	9a	21,5kg	1a e 5m	1a e 4m	Estágio I DL
Cão 8	SRD	9a	17kg	1a e 1 m	1 ano	Estágio I DL
Cão 9	SRD	3a 6 m	11kg	1a e 5m	1 ano	Estágio I DL
Cão 10	Pit Bull	5a	30,1kg	4 meses	3 meses	Estágio II DM
Cão 11	SRD	3a	13kg	3 meses	1 mês	Estágio III DS

DL= doença leve

DM= doença moderada

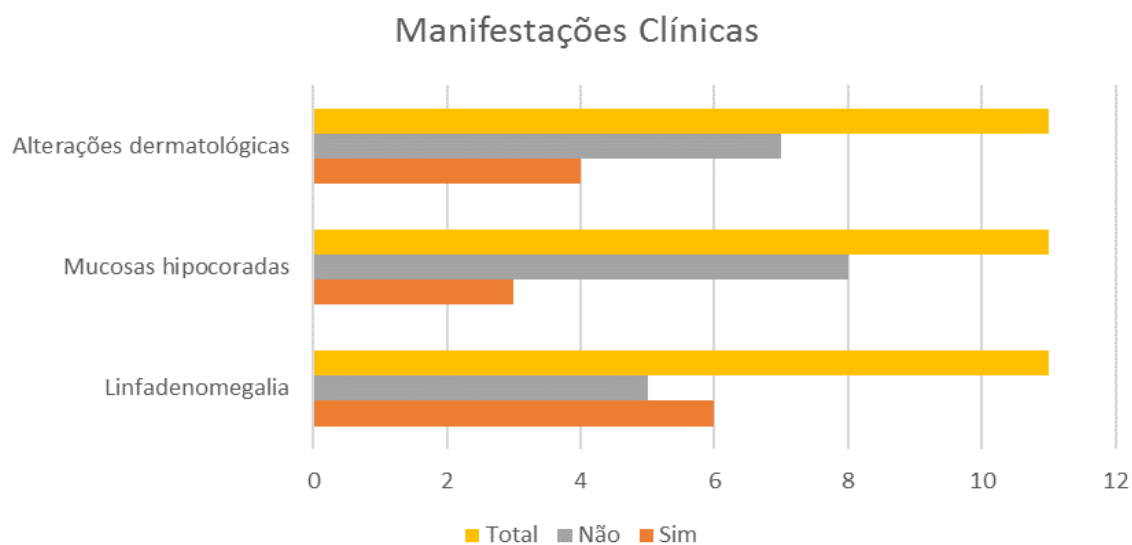
DS= doença severa

SRD= sem raça definida

\*Estadiamento clínico (SOLANO-GALLEGO et al., 2009)

Os cães, na sua maioria, apresentaram-se clinicamente saudáveis ou com alterações discretas. As alterações mais observadas foram hipertrofia de linfonodos em 54,5% (6/11), mucosas hipocoradas em 27,3% (3/11) e alterações dermatológicas em 36,4% (4/11) dos cães (**Gráfico 1**). Combinando os dados de exame físico e de patologia clínica, os cães foram classificados em três estágios clínicos; estágio I, quando apresentavam sinais clínicos leves, como linfadenomegalia ou dermatite papular, sem alterações aos exames de patologia clínica. Os cães classificados no estágio II foram aqueles que apresentavam lesões cutâneas simétricas, epistaxe, febre, perda de peso e/ou anorexia, associados a anemia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia,  $UPC > 0,4 < 1,0$  nos exames laboratoriais. Os cães no estágio III, além de apresentarem os sinais clínicos do estágio I e II, já manifestavam sinais sugestivos de doença por deposição de imunocomplexos, tais como uveíte, vasculite, artrite e/ou glomerulonefrite.

**Gráfico 1-** Alterações clínicas observadas no exame clínico dos cães com leishmaniose que estavam sob tratamento com alopurinol, no momento da coleta de amostras para estudo farmacocinético de alopurinol e oxipurinol.



As amostras biológicas dos cães foram utilizadas para avaliação hematológica, dosagem de ALT, FA, proteínas total, albumina e globulinas, dosagem de ureia e creatinina no soro, sumário de urina e avaliação da UPC.

Na avaliação hematológica, 18,2% (2/11) dos cães apresentaram valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito inferiores ao limite mínimo (Tabela 2). A contagem dos leucócitos totais revelou que 9,1% (1/11) dos cães infectados

apresentaram leucopenia; 36,4% (4/11) apresentaram eosinofilia; 18,2% (2/11) eosinopenia e 9,1% (1/11) basofilia. Achados de plaquetopenia foram observados em 11,1% (1/9) dos cães neste estudo.

Achados de hiperproteinemia (Tabela 2) foram observados em 54,5% (6/11) dos cães no presente estudo, com média de  $8,7 \pm 1,76$  g/dL, valor mínimo de 6,8 g/dL, máximo de 12,0g/dL e mediana de 6,8g/dL. Em quatro cães, os valores encontrados foram superiores a 10g/dL.

Os demais parâmetros avaliados no hemograma apresentaram valores médios dentro do limite de referência para cães. Porém, quando avaliado o limite mínimo e máximo encontrados para eosinófilos, os valores foram inferiores e superiores ao valor de normalidade, apesar do valor médio estar dentro dos limites de referência da normalidade para cães.

**Tabela 2:** Perfil hematológico e bioquímico de cães naturalmente infectado com *Leishmania infantum* em uso contínuo de alopurinol.

Animais/ Índice hematológicos	VN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Média ± DP	Mediana	Valor Mínimo	Valor Máximo
Eritrócito (x10 <sup>6</sup> /μL)	5.5 – 8.5	7.7	<b>3.65</b>	6.94	7.8	6.68	5.7	7	6.4	7.4	7.3	<b>4.52</b>	6.45 ± 1.33	6.94	3.65	7,8
Hemoglobina (g/dL)	12-18	15,3	<b>8,0</b>	14,3	16,1	13,8	<b>11,7</b>	16,4	15,4	17,3	13,2	<b>9,2</b>	13,7 ± 2,98	14,3	8,0	17,3
Hematócrito (%)	37-55	47	<b>22,8</b>	43	46,9	41,5	37	49	46	51	43	<b>28,3</b>	41,3± 8,75	43	22,8	51
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)	6 - 17	8.2	11.1	8.2	10.2	14	11.8	7.1	12.4	2.900	10.4	<b>2.4</b>	9.882 ±3.276	10.400	8.200	14.000
Bastonetes (μL)	0-300	0	0	164	102	0	0	0	124	0	0	48	39,82 ±61,27	0	102	164
Segmentados (μL)	3.000-11.500	<b>2.870</b>	6.771	5.740	7.446	7.140	9.440	3.337	7.812	6.966	8,32	<b>1.056</b>	6.082± 2.583	6.966	1.056	9.440
Linfócitos (μL)	1.000-4.800	4.674	2.109	1.886	1.326	4.480	1.298	2.556	3.348	1.935	1.664	1.008	2.389 ±1.258	1.935	1.008	4.480
Monócitos (μL)	150-1.350	574	555	328	510	700	472	497	248	774	774	<b>144</b>	455±202	497	144	700
Eosinófilos (μL)	100-1.250	<b>82</b>	<b>1554</b>	<b>82</b>	816	<b>1680</b>	590	<b>2.556</b>	868	<b>3.225</b>	208	144	1.073 ±1.605	816	82	3.225
Basófilos (μL)	Raros	0	111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10 ± 33	0	0	111
PPT*(g/L)	7,0-8,0	<b>&gt;12</b>	<b>9,2</b>	<b>10,4</b>	8,0	7,0	<b>12,0</b>	7,0	6,8	7,0	<b>9,1</b>	<b>10,8</b>	8,7 ±1,76	8,6	6,8	12
Plaquetas (10 <sup>3</sup> / μL)	166-575	204	**	<b>115</b>	328	246	550	250	334	294	385	**	301 ± 122.76	294	115	550
<b>Bioquímica sérica</b>																
ALT (U/L)	15 – 73	41	17	22	38	<b>78</b>	34	41	29	17	<b>108</b>	68	45±29	38	17	108
FA (U/L)	20 – 156	33	149	<b>207</b>	107	<b>165</b>	41	52	49	82	141	33	96 ±61	82	33	207
Uréia (mg/dL)	21,4 – 59,9	55	47,7	32,3	27,7	33,5	48,4	26	21	21	46	23	34,7±12,4	32,3	21	55
Creatinina (mg/dL)	0,5 – 1,5	1,2	1,3	1,1	0,9	0,9	1,3	0,9	1,1	1,1	1,1	0,9	1,1±0,2	1,1	0,9	1,3
Pt (g/dL)	5,4 – 7,1	12,7	8,8	6,9	7,9	6,3	9,8	6,7	5,8	6,7	7,1	8,2	7,9±2,0	7,1	6,3	12,7
Albumina (g/dL)	2,6 – 3,3	<b>2,4</b>	<b>1,3</b>	<b>1,9</b>	2,8	<b>1,6</b>	2,6	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>2,3</b>	<b>2,2</b>	<b>1,5</b>	2,1±0,5	2,0	1,3	2,8
Globulinas (g/dL)	2,7 – 4,4	<b>10,3</b>	<b>7,5</b>	<b>5,0</b>	<b>5,1</b>	<b>4,7</b>	<b>7,2</b>	<b>4,7</b>	3,8	4,4	<b>4,9</b>	<b>6,7</b>	5,8±1,9	5,0	3,8	10,3
A/G	0,59 – 1,11	<b>0,23</b>	<b>0,17</b>	<b>0,38</b>	<b>0,55</b>	<b>0,34</b>	<b>0,36</b>	<b>0,43</b>	<b>0,53</b>	<b>0,52</b>	<b>0,45</b>	<b>0,22</b>	0,38±0,13	0,38	0,17	0,55

**Tabela 2:** Perfil hematológico e bioquímico de cães naturalmente infectado com *Leishmania infantum* em uso contínuo de alopurinol.

Continuação

<b>Bioquímica urinária</b>																
Pt Ur (mg/dL)	-	174	101,9	110	0,7	3,4	75,8	13,1	13,1	15,1	169,3	123,8	72,75 ±66,98	75,80	0,7	174
Creat. Ur (mg/dL)	-	180	240	160,9	79,1	103,8	173,5	95	75	77,5	179,5	49,5	128,35±60,79	103,80	75	240
UPC	*	0,97	0,42	0,68	0,01	0,03	0,44	0,14	0,17	0,19	0,94	2,61	0,60 ± 0,75	0,42	0,01	2,61

VN: Valor de normalidade; \* PPT: Proteína plasmática total dosado pela técnica de refratometria; ALT: alanina aminotransferase, FA: fosfatase alcalina, Pt: proteínas totais; A/G: razão albumina globulina; \*Valor de referência: UPC < 0,5 normal, 0,5 – 1-0 limítrofe; > 1,0 nefrite glomerular

Fonte: Kaneko et al., 2008

Os exames bioquímicos séricos mostraram que os valores de proteínas totais quantificadas no soro estavam elevados em 45,4% (5/11) dos cães, sendo a média  $\pm$  SD calculados em  $7,9 \pm 2,0$  g/dL e a mediana determinada em 7,1 g/dL (Tabela 2). Os valores de média  $\pm$  SD da razão albumina/globulina foram determinados em  $0,38 \pm 0,13$  g/dL e a mediana em 0,38 g/dL, resultados inferiores aos valores de referência (VR=0,59-1,11) para a espécie (KANEKO et al., 2008). Os valores de ALT estavam elevados em 18,2% (2/11) dos cães, tendo sido encontrada no grupo a média  $\pm$  SD da atividade sérica de  $45 \pm 29$  U/L, mínimo de 17 U/L e máximo de 108 U/L (VR=15-73). A FA estava acima dos valores normais em 18,2% (2/11) dos cães, no entanto, quando avaliada em grupo, a média  $\pm$  SD da atividade sérica ficou em  $96 \pm 61$  U/L e a mediana de 33U/L dentro do intervalo de normalidade (VR=20-156).

Em relação aos resultados encontrados para a ureia e creatinina, todos os cães apresentaram os valores individuais dentro dos limites de referência para a espécie canina (Ureia VR= 21,4 – 59,9; Creatinina VR= 0,5 -1,5), sendo encontrado no grupo o valor médio  $\pm$  SD de  $34,7 \pm 12,4$  mg/dL para uréia e  $1,1 \pm 0,2$  mg/dL para creatinina.

Os resultados da urinálise dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* encontram-se descritos na Tabela 3. A avaliação da densidade urinária do grupo mostrou variação de 1,010 a 1,044 com média  $\pm$  SD de  $1,025 \pm 0,012$  e mediana de 1,020 (VR=1,030). Quatro cães apresentaram valores de densidade de 1,030 a 1,044, densidade urinária superior a 1,030, indicando que os túbulos renais concentram a urina. Sete cães apresentaram valores menores que 1,030, indicando isostenúria, ou seja, a densidade urinária é igual a densidade do plasma. O pH urinário apresentou-se alcalino em 27,3% (3/11) das amostras analisadas com pH acima de 7,5 (VR = 5,5 – 7,5). Verificou-se proteinúria, detectada por fitas reagentes em 63,6% (7/11) dos cães analisados. A bilirrubina estava presente em 36,4% (4/11) das amostras de urina dos cães. A presença de hematória foi observada em 9,1% (1/11), leucocitúria em 27,3% (3/11) e bacteriúria em 27,3% (3/11) dos cães. Identificou-se cristalúria em 27,3% (3/11) dos cães, sendo que cada cão apresentou um tipo de cristal, de urato de amônio, de xantina e de urato amorfo. A quantificação da proteína urinária foi realizada por analisador bioquímico com kits reagentes específicos. Na avaliação da relação proteína/creatinina urinária (UPC), 45,5% (5/11) dos cães apresentaram valor de referência normal ( $< 0,2$ ), enquanto 18,2% (2/11) dos cães tiveram valores limítrofes (0,2 – 0,5) e 36,4% (4/11) dos cães apresentaram valor acima de 0,5, de acordo com os valores referenciais indicados pela Internacional Renal Interest Society, (IRIS, 2016).

**Tabela 3** - Sumário de urina de cães infectados naturalmente por *L. infantum* e em uso de alopurinol a cada 12 horas

Exame	Animais/ Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Físico	Cor	Amarelo citrino	Amarelo claro	Amarelo ouro	Amarelo citrino	Amarelo citrino	Amarelo ouro	Amarelo	Amarelo claro	Amarelo palha	Amarelo claro	Amarelo claro
	Aspecto	Límpido	Límpido	Ligeiramente turvo	Ligeiramente turvo	Límpido	Turvo	Límpido	Ligeiramente turvo	Límpido	Ligeiramente turvo	Límpido
	Densidade	1,044	1,020	1,036	1,020	1,026	1,044	1,014	1,010	1,010	1,030	1,020
Químico	Proteína total	+++	+	+	+	++	Traços	-	-	-	++	+++
	pH	6,0	5,5	8,0	7,0	6,0	6,0	8,0	6,5	9,0	6,0	7,5
	C. Cetônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bilirrubina	-	-	Traços	-	+	+	+	-	-	+	-
	Glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Urobilinogênio	Traços	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	-	-	-	Normal	-
	Sangue	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedimento	Leucócitos	Raríssimo	0-3/campo	Raros	-	3-6/campo	Raros	-	Numerosos	0-2/campo	10-15/campo	3-5/campo
	Hemácias	-	3-5/campo	-	-	2-3/campo	-	Raras	0-4/campo	-	Raras	0-2/campo
	Bactérias	+	+	Raras	+	+	++++	-	+++	Raras	++	-
	Células	Transição raras	Transição ++	Transição +	Transição +	Epitelial raras	Transição +	Pélvica + Transição ++	Transição +	Descamação + Transição ++	Transição e Pelve +	Vesicais +
	Cilindros	-	-	-	Granulócitos raríssimos	-	-	-	-	-	-	-
	Cristais	-s	-	-	-	Urato de amônio (raros)	Xantina +	-	-	-	Urato Amorfos +	-

Bilirrubina, bactéria. (+) leve, (++) moderada, (+++) severa. Cpo= Campo. (-) Ausente

Proteína: (+) 30mg/dL, (++)100mg/dL, (+++) 300mg/dL

Hemácias 0-3/ campo normal (cistocentese); 0-5/ campo (sonda); 0-7/ campo (micção espontânea) Fonte: Garcia-Navarro, (2005)

Leucócitos 0-3/ campo (cistocentese); 0-5/ campo (sonda); 0-7/ campo (micção espontânea)



### 6.1. Validação do método em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UltraVioleta (HPLC-UV)

O ensaio do alopurinol e oxipurinol foi realizado usando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) empregando a coluna LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5 µm) com tempo de corrida estabelecido em 12 min. A fase móvel foi constituída pela mistura de água acrescida de 0,1% de ácido fórmico (88%) e 0,25% de acetonitrila, e os tempos de retenção foi aproximadamente de 6,0 min para oxipurinol, 7,8 min para alopurinol e 9,9 min para o padrão interno (aciclovir) (**Figura 12**).

O limite inferior de detecção foi de 0,1 µg/mL, tanto para o alopurinol quanto seu metabólito ativo. Na análise do alopurinol e oxipurinol as curvas de calibração construídas apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,99 (**Tabela 4**).

O alopurinol e oxipurinol apresentaram-se estáveis em relação aos três ciclos de congelamento e descongelamento, armazenamento à temperatura ambiente (25°C) durante 4 horas e permanência pós-processamento a 12°C durante 24 horas.

**Tabela 4:** Limites de confiança do método de análise do alopurinol e oxipurinol em plasma de cão

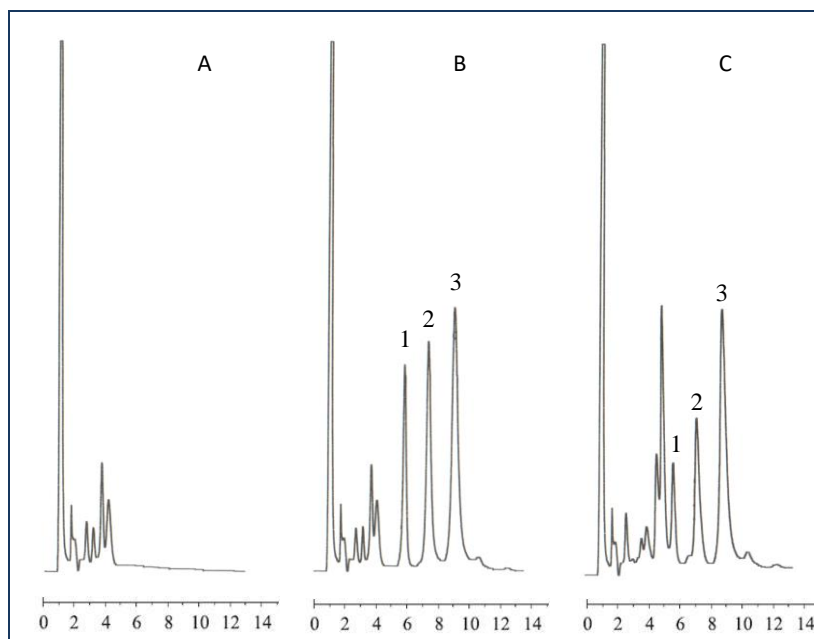
	Alopurinol			Oxipurinol		
<b>Linearidade</b>	0,1 – 20,0 µg/mL plasma			0,1 – 20,0 µg/mL plasma		
<b>Equação da reta</b>	$y = 0,15257x - 0,02218$			$y = 0,13523x - 0,0166$		
<b>(r)</b>	0,99962			0,99966		
<b>(r<sup>2</sup>)</b>	0,99924			0,99933		
<b>*Recuperação Absoluta (%)</b>						
<b>(n=10)</b>	87%			86%		
<b>Aciclovir - PI (n=10)</b>	89%					
<b>Precisão e Exatidão</b>						
<b>Intracorridas</b>	<b>Média</b>	<b>CV%</b>	<b>EPR%</b>	<b>Média</b>	<b>CV%</b>	<b>EPR%</b>
LIQ (0.1 µg/mL, n=5)	0,10	5,64	-0,20	0,10	3,96	-4,40
CQB (0.25 µg/mL, n=5)	0,23	3,74	-7,68	0,22	3,53	-11,68
CQM (10.0 µg/mL, n=5)	10,53	1,84	5,32	10,12	1,87	1,18
CQA (16.0 µg/mL, n=5)	16,45	1,53	2,81	15,76	1,49	-1,49
<b>Intercorridas</b>	<b>Média</b>	<b>CV%</b>	<b>EPR%</b>	<b>Média</b>	<b>CV%</b>	<b>EPR%</b>
LIQ (0.1 µg/mL, n=5)	0,10	9,22	1,40	0,10	6,90	-3,60
CQB (0.25 µg/mL, n=5)	0,24	3,01	-3,68	0,24	4,55	-5,97
CQM (10.0 µg/mL, n=5)	10,19	4,81	1,90	10,01	4,82	0,07
CQA (16.0 µg/mL, n=5)	15,14	5,14	-5,40	14,79	5,03	-7,53
<b>Estabilidade</b>						
<b>Congelamento e Descongelação</b>	<b>Média</b>	<b>CV%</b>	<b>EPR%</b>	<b>Média</b>	<b>CV%</b>	<b>EPR%</b>
CQB (0.25 µg/mL, n=5)	0,24	3,24	-3,36	0,22	2,38	-12,00
CQA (16.0 µg/mL, n=5)	16,73	3,18	4,56	17,46	3,05	9,13
<b>Pós-Processamento (12°C - 24h)</b>	<b>Média</b>	<b>CV%</b>	<b>EPR%</b>	<b>Média</b>	<b>CV%</b>	<b>EPR%</b>
CQB (0.25 µg/mL, n=5)	0,23	9,88	-8,16	0,22	9,96	-12,48
CQA (16.0 µg/mL, n=5)	14,22	1,38	-11,3	14,45	1,47	-9,70
<b>Curta Duração (25°C - 4h)</b>	<b>Média</b>	<b>CV%</b>	<b>EPR%</b>	<b>Média</b>	<b>CV%</b>	<b>EPR%</b>
CQB (0.25 µg/mL, n=5)	0,26	0,52	3,04	15,65	3,68	-2,20
CQA (16 µg/mL, n=5)	0,27	5,38	9,78	16,40	3,44	2,49

r = coeficiente de correlação linear; r<sup>2</sup> = coeficiente de determinação; CV = coeficiente de variação, EPR = erro padrão relativo; LIQ = limite inferior de quantificação; CQB = controle de qualidade de baixa concentração; CQM = controle de qualidade de média concentração; CQA = controle de qualidade de alta concentração

\*Recuperação = média determinada através pela razão analito processado/analito em solução x 100, nas concentrações de alopurinol e oxipurinol de 0.25µg/mL (CQB, n=5) e 16.0 µg/mL (CQA, n=5), e aciclovir de 40,0 µg/mL solução (n = 10).

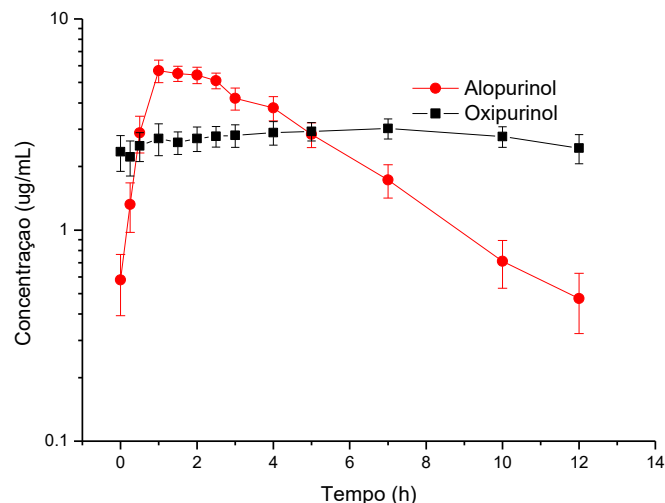
A **figura 12** representa os cromatogramas referentes a separação do alopurinol, oxipurinol e o padrão interno Aciclovir.

**Figura 12:** Cromatogramas: A) Plasma branco; B) Solução padrão de 5 µg/mL plasma; C) Amostra de plasma coletada no tempo de 2h após a administração por via oral na dose de 10mg/kg de alopurinol. 1 = Oxipurinol; 2 = Alopurinol; 3 = Aciclovir (Padrão Interno)



Os valores médios das concentrações de alopurinol e oxipurinol no plasma em função do tempo de coleta foram representados graficamente (**Figura 13**). A curva descrita é consistente com a cinética de primeira ordem.

**Figura 13:** Curvas de concentração plasmática vs tempo de alopurinol e oxipurinol após a administração oral de 10mg/kg de alopurinol. Média  $\pm$  erro padrão da média



Observou-se absorção rápida do alopurinol, com concentração máxima no plasma ( $C_{max}$ ) de  $6,00 \pm 1,78 \mu\text{g/mL}$  obtidos no tempo máximo para atingir  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ) entre 1 a 3 h ( $T_{max}$  médio  $1,50 \pm 0,67$  horas). A constante de velocidade de eliminação ( $K_{el}$ ) foi determinada de  $0,31 \pm 0,17$  por h. O volume de distribuição corrigido pelo peso em função da dose administrada ( $V_d/F/Kg$ ) foi de  $1,37 \pm 0,83 \text{ L/Kg}$ . O *clearance* ( $Cl$ ) encontrado foi de  $0,35 \pm 0,11 \text{ L/h/Kg}$ , e a área sob a curva ( $AUC$ ) foi de  $27,20 \pm 7,80 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ . Para o oxipurinol, foi possível obter a concentração máxima no plasma ( $C_{max}$ ) de  $3,08 \pm 0,68 \mu\text{g/mL}$  alcançado entre 0,5 a 10 h ( $T_{max}$  médio  $5,90 \pm 3,60$  h) e a área sob a curva de  $33,87 \pm 13,10 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ . Os valores médios encontram-se descritos na **Tabela 5 e 6** para cada analito. Os parâmetros farmacocinéticos para cada cão estão listados na **Tabela 5** (alopurinol) e na **Tabela 6** (oxipurinol).

**Tabela 5:** Parâmetros farmacocinéticos do alopurinol no plasma de cão. Dados individuais com média e desvio-padrão (DP).

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Média±DP	VM literatura*
<b>Parâmetros</b>													
Cl/F (L/h)	13,31	19,73	12,15	5,33	8,31	8,79	6,07	5,86	1,91	7,39	3,92	9,09 ± 4,77	-
Cl/F/Kg (L/h/Kg)	0,37	0,44	0,51	0,47	0,20	0,21	0,28	0,34	0,17	0,24	0,39	0,35 ± 0,11	-
Vd/F (L)	21,56	39,10	65,49	34,11	47,13	51,78	20,38	12,52	7,81	40,10	10,68	34,29±17,91	-
Vd/F/Kg (L/Kg)	0,60	0,87	2,75	3,02	1,12	1,23	0,95	0,74	0,71	1,30	1,07	1,37 ±0,83	1,17±0,07
Tmax (h)	1,00	2,00	1,50	1,00	1,00	1,00	2,00	3,00	1,00	1,00	1,50	1,50±0,67	1,9±0,01
Cmax (ug/mL)	4,72	3,46	4,57	5,70	5,20	8,59	5,70	6,92	9,02	9,15	6,03	6,00±1,78	6,43±0,18
t <sub>1/2</sub> (hr)	1,12	1,37	3,74	4,44	3,93	4,08	2,33	1,48	2,83	3,76	1,89	2,81±1,29	2,69±0,14
Kel (1/h)	0,62	0,50	0,19	0,16	0,18	0,17	0,30	0,47	0,24	0,18	0,37	0,31±0,17	0,26±0,01
AUC 0-12h Alo (h*ug/mL)	22,54	22,81	16,46	18,78	24,06	34,12	32,97	34,10	52,26	40,58	25,54	27,20±7,80	-

Cl\_F = clearance aparente; Vd= volume de distribuição; Tmax = tempo para atingir Cmax; Cmax = concentração máxima; t<sub>1/2</sub> = meia-vida de eliminação; Kel = constante de eliminação; AUC 0-12 = área sob a curva no intervalo de dose (0-12h). Cálculos realizados pelo software WinNonlin versão 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA), modelo não-compartimental (modelo 200).

\*VM literatura: Valor médio encontrado em cães Dálmatas saudáveis

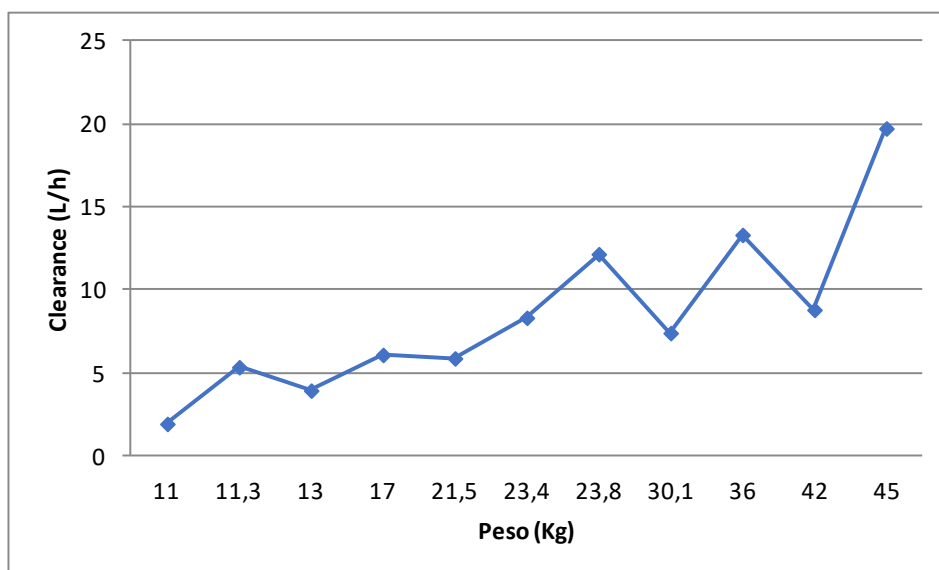
**Tabela 6:** Parâmetros farmacocinéticos do oxipurinol no intervalo de 0-12h no plasma de cão. Dados individuais com média e desvio-padrão (DP).

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Média±DP
<b>Parâmetros</b>												
Cmax (ug/mL)	2,28	4,03	2,98	1,81	3,28	3,48	3,42	2,93	6,72	3,82	2,73	3,08±0,68
Tmax (h)	10	10	7	5	0,5	4	7	10	1	0,5	5	5,90±3,60
AUC 0-12h Oxi (h*ug/mL)	16,00	36,13	65,31	31,48	22,75	34,33	36,93	31,48	31,06	38,48	25,78	33,87±13,10

Tmax = tempo para atingir Cmax; Cmax = concentração máxima; AUC 0-12 = área sob a curva no intervalo de dose (0-12h).

A **figura 14** mostra a relação entre o *Clearance* vs Peso dos animais com Leishmaniose tratados em esquema de dose múltipla oral de 10mg/kg de alopurinol – duas vezes ao dia. Os dados remetem que há uma relação de proporcionalidade entre peso e *Clearance*, o que reflete a variação de peso como um viés para o estudo de farmacocinética. Desta forma, essa relação ( $Cl \times \text{Peso}$ ) reflete que não se tem uma concentração plasmática constante no grupo.

**Figura 14:** Relação entre *Clearance* vs Peso dos cães com leishmaniose que estavam em uso de alopurinol com dose múltipla, 10mg/kg, duas vezes ao dia.



A tabela 7 remete os valores normalizados (corrigidos pela média do peso dos animais  $n=200$ ) de  $C_{\text{máx}}$  e AUC. E pode-se observar média de  $C_{\text{máx}}$  de 6,24  $\mu\text{g/mL}$  e sem normalizar  $C_{\text{máx}}$  apresenta-se também como 6,0  $\mu\text{g/mL}$  dados semelhantes aos apresentados por Ling et al., (1997). Para AUC normalizado o valor foi de 27,12  $\mu\text{g.h/mL}$  e sem normalizar foi de 27,2  $\mu\text{g.h/mL}$ , valores que nos permite fazer nossa discussão sobre os valores não normalizados como um todo.

**Tabela 7-** Dados dos parâmetros farmacocinéticos Cmax e AUC normalizados em função da dose

<b>Parâmetros/ Animais</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>Dose (mg)</b>	300	450	200	100	200	300	200	200	100	300	100
<b>Cmax (µg/mL)</b>	4,72	3,46	4,57	5,70	5,20	8,59	5,70	6,92	9,02	9,15	6,03
<b>Cmax alopurinol normalizado (µg/mL)</b>	3,15	1,54	4,57	11,40	5,20	5,72	5,70	6,93	18,04	6,10	12,06
<b>AUC 0-12h alopurinol (h*µg/mL)</b>	22,54	22,81	16,46	18,78	24,06	34,12	32,97	34,10	52,26	40,58	25,54
<b>AUC 0-12h Alopurinol normalizado para dose de 200mg (h*µg/mL)</b>	15,03	10,13	16,46	37,56	24,06	22,75	32,97	34,10	104,52	27,05	51,08

**Cl<sub>F</sub>** = clearance aparente; **V<sub>d</sub>**= volume de distribuição; **T<sub>max</sub>** = tempo para atingir Cmax; **Cmax** = concentração máxima; **t<sub>1/2</sub>** = meia-vida de eliminação; **K<sub>el</sub>** = constante de eliminação; **AUC 0-12** = área sob a curva no intervalo de dose (0-12h). Cálculos realizados pelo software WinNonlin versão 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA), modelo não-compartimental (modelo 200).

## 7. DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a avaliar a farmacocinética do alopurinol e do seu metabólito ativo oxipurinol em cães portadores de leishmaniose naturalmente adquirida, até onde alcançou nossa atualização da literatura. O estudo da avaliação da cinética do alopurinol e oxipurinol em cães exigiu o desenvolvimento e a validação do método de análise sequencial desses analitos em plasma, com limite de confiança compatível com a aplicação em pesquisa de farmacocinética de dose múltipla. O método da análise foi desenvolvido e validado utilizando coluna RP-8 e LC-UV.

No estudo realizado em soro humano, Reinders et al. (2007) utilizaram o método de HPLC com a coluna LiChrospher 100 RP-18 para quantificação de alopurinol e oxipurinol, sendo a fase móvel constituída por uma solução tampão de acetato de sódio em pH=4,5. Os tempos de retenção obtidos pelos autores foram 9,9, 12,3 e 17,7 minutos para oxipurinol, alopurinol e aciclovir respectivamente com corrida total de 22 minutos. No presente estudo, os dados encontrados mostram menor tempo de retenção 6,0, 7,8 e 9,9 min, para o oxipurinol, alopurinol e aciclovir respectivamente e um tempo de corrida total de 12 minutos. O alopurinol e oxipurinol foram extraídos do plasma canino com o agente extrator acetonitrila e os valores de recuperação obtidos foram de 87% e 86% respectivamente. Enquanto Reinders et al. (2007) realizaram extração em soro humano e encontraram valor de recuperação de 65% e 75% para alopurinol e oxipurinol, respectivamente.

Comparado ao valor do limite inferior de detecção de 2µg/mL, encontrado por Ling et al. (1997), em um estudo com alopurinol em cães saudáveis o valor achado no presente estudo, de 0,1 µg/mL, tanto para o alopurinol quanto seu metabólito ativo, mostra a boa sensibilidade do método de HPLC-UV empregado. Considerando-se os limites de confiança encontrados na validação do método, conclui-se que o sistema de HPLC-UV, para análise do alopurinol e oxipurinol em plasma de cão, é compatível ao estudo de farmacocinética em dose múltipla do alopurinol nessa espécie.

O alopurinol já vem sendo utilizado com finalidade terapêutica em cães infectados por *L. infantum* há mais de 20 anos (DENEROLLE; BOURDOISEAU et al., 1999; PLEVRAKI, et al., 2006), porém não há na literatura estudo sobre a disposição dessa droga no organismo de cães com leishmaniose visceral.

Os cães analisados no presente estudo apresentavam diferentes pesos, raças, idade e estágios clínicos. O estadiamento clínico dos cães no presente estudo mostrou-se



compatível com as descrições da literatura sobre a doença canina por *L. infantum* em diferentes áreas geográficas (AMUSATEGUI et al., 2003; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; 2011), e foi determinado de acordo as alterações clínicas e laboratoriais que cada cão apresentou, conforme método descrito previamente (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). A grande maioria (10/11) dos cães que cumpriram os requisitos para inclusão no estudo encontrava-se nos estágios I e II da doença, ou seja, de doença leve a moderada. Os sinais clínicos observados nos cães do presente estudo se assemelham aos descritos por outros autores em cães tratados com alopurinol (CAVALIEIRO et al., 1999; PLEVRAKI et al., 2006). Esses autores retratam que os cães sob tratamento de fato apresentam alguns sinais clínicos, porém em menor intensidade.

O achado de anemia normocítica normocrômica corrobora resultados encontrados previamente em cães sob tratamento com antimoníato de meglumine e mesmo naqueles clinicamente doentes e sem tratamento (IKEDA-GARCIA et al. 2008; FREITAS et al. 2012). Outros estudos descrevem um maior percentual de achados de anemia do tipo normocítica hipocrômica (ABREU-SILVA et al., 2008; DIAS et al., 2008). Diversos autores descrevem a anemia como uma das principais alterações laboratoriais encontradas em cães portadores de LV (CIARAMELLA et al., 1997; IKEDA et al., 2003; REIS et al., 2006; COSTA-VAL et al., 2007; SILVA et al., 2011). O desenvolvimento de anemia na LV canina tem sido atribuído à redução da produção de eritropoietina, comumente observada em doenças renais crônicas (THRALL et al., 2014; BRAZ et al., 2015 ) ao sequestro esplênico e lise de hemácias decorrentes da produção de auto-anticorpos (IKEDA et al. 2003), à hipoplasia ou aplasia da medula óssea associadas a diversas citocinas produzidas pelo hospedeiro doente (FREITAS et al., 2012) e ainda a deficiências nutricionais relacionadas às condições patológicas (THRALL et al., 2014).

No presente estudo, a baixa porcentagem de cães com anemia pode ser atribuída à melhora clínica decorrente do tratamento poliquimioterápico instituído, que incluiu a administração do alopurinol. Ressaltamos que os hemogramas, com o objetivo de estabelecer o estágio clínico dos cães no presente estudo, foram realizados em um momento em que o alopurinol, como droga leishmanioestática de manutenção, vinha sendo ministrada em seguida ao protocolo inicial com cetoconazol e metronidazol. Um quadro semelhante foi também observado por outros autores, que associam a melhora da anemia nos cães após o início do tratamento com antimoníato de meglumine entre 30 e 60 dias (IKEDA-GARCIA et al., 2008). Porém Cavaleiro e colaboradores (1999)

observaram a persistência da anemia microcítica normocrômica em cães após o tratamento exclusivo com alopurinol. No presente estudo, dois cães (nº 2 e 11) apresentavam anemia que manteve-se apesar do tratamento.

Normalmente espera-se que a anemia desapareça ou que os parâmetros hematológicos se aproximem da normalidade com o decorrer do tratamento (IKEDA-GARCIA et al., 2008). No entanto, o cão nº2 encontrava-se em tratamento a longo prazo, porém apresentou um quadro mais crítico quando comparado aos resultados dos outros animais. Demonstrado pela presença de alterações clínicas, anemia normocítica normocrômica, hipoalbuminemia, razão albumina/globulina bastante diminuída, tendência a alteração hepática pois o valor da enzima ALT encontrava-se próximo ao limite mínimo de referência para a espécie. Não foi possível a contagem de plaquetas, provavelmente devido a agregação plaquetária causada por hiperglobulinemia.

Achados como estes em cães em tratamento pode estar indicando uma reativação da doença por uma falha na resposta imune ou tratamento, doença ativa ou uma reinfecção (DENEROLLE; BOURDOISEAU, 1999; IKEDA-GARCIA et al., 2008), principalmente quando a razão A/G está muito baixa indica uma inversão de proteínas, com aumento de globulinas (REIS et al., 2006; RIBEIRO et al., 2013). Essa redução da relação A/G foi bem evidente nos cães nº2 e nº11 que apresentaram maiores alterações nos exames laboratoriais em relação aos demais animais. A diminuição dos eritrócitos pode estar relacionada com a supressão da medula óssea que pode ocorrer devido ao processo inflamatório causado pela presença do parasito, por sequestro esplênico ou destruição de eritrócitos por produção de auto-anticorpo (IKEDA et al., 2003; COSTA-VAL et al., 2007).

O cão de nº11, estava no início do tratamento, apresentava alteração renal com evidente proteinúria e elevado valor de UPC sugerindo glomerulonefrite, apesar de não apresentar quadro de azotemia. Logo, acreditamos que a diminuição de eritrócitos não foi causada por redução da produção de eritropoietina já que esse cão não apresentava quadro de insuficiência renal. Pois para que ocorra diminuição de eritrócitos causada por doença renal, pelo menos 70% da função renal deve estar comprometida (SOLANO-GALLEGO et al., 2011) o que não foi visto neste cão. A anemia presente pode ter ocorrido por uma redução da produção de eritrócitos devido a hipoplasia ou aplasia da medula óssea referente ao processo infeccioso, assim como a redução notável da produção de células brancas (IKEDA et al., 2003; BRAZ et al., 2015), essa característica indica quadro de infecção crônica.

Neste cão também foi evidente a relação A/G bastante reduzida em relação ao valor de referência para cães, o que caracteriza diminuição de albumina e aumento de globulinas. A hipoalbuminemia pode estar relacionada a perda de proteína pela urina, já que os valores das enzimas hepática estão dentro do valor de normalidade. A hiperglobulinemia está relacionado a resposta do organismo a doença o que leva a uma alta produção de anticorpos e os auto-anticorpos podem levar a destruição ou agregação plaquetária (IKEDA et al., 2003; THRALL et al., 2014), como foi visto no cão do presente estudo, pois não foi possível a contagem de plaquetas.

Esses achados só reforçam a importância do acompanhamento dos cães sob tratamento com exames laboratoriais para avaliar a resposta do organismo no controle da doença. Já que o tratamento não leva a cura parasitológica e pode haver falha terapêutica por parte do proprietário ou falha imunológica relacionada ao próprio indivíduo.

Apenas um (1/11) cão do presente estudo apresentou leucopenia discreta e nenhum apresentou leucocitose. A leucopenia foi reportada em taxas de 36,8% e 27,27% de cães com LV (SILVA et al., 2011; BRAZ et al., 2015). A redução nas contagens de leucócitos, segundo Alvar et al. (2004), pode ser devida a diminuição de monócitos, eosinófilos e linfócitos em quadros graves de LV. Outros autores têm relatado leucocitose por neutrofilia em 27% e 33% dentre cães infectados (IKEDA et al., 2003) e Freitas et al. (2012). Essa leucocitose é atribuída a infecções bacterianas secundárias à LV canina, e não necessariamente à doença primária (IKEDA et al., 2003). No presente estudo, ressaltamos que os cães, já em tratamento para LV, encontravam-se sob monitoramento terapêutico e, portanto, com chances mínimas de terem infecções concomitantes.

Quanto aos 36,4% dos cães deste estudo que apresentaram eosinofilia, aos 18,2% que apresentavam eosinopenia, além dos 9,1% com basofilia, podemos considerar que são achados similares aos de outros autores, e caracterizam a LV canina sob tratamento (IKEDA et al. 2003; DIAS et al. 2008; SILVA et al. 2011). De acordo com Ikeda et al. (2003), a eosinofilia não é um achado exclusivo da LV canina, pode estar relacionada a outros fatores como hipersensibilidade e parasitismo intestinal, principalmente quando está associada a basofilia.

O achado de plaquetopenia foi observado em apenas um cão (11,1%) neste estudo, embora vários autores considerem que trombocitopenia é bastante frequente em cães com LV (CIARAMELLA et al. 1997; SILVA et al., 2011; FREITAS et al., 2012).

A trombocitopenia na LV canina pode ocorrer devido à ausência de produção, consumo ou destruição plaquetária, vasculite ou por depósito de imunocomplexos (MEYER, 1995; BRAZ et al., 2015). Mais uma vez, a baixa taxa de anormalidade plaquetária encontrada no presente estudo é naturalmente esperada em cães sob tratamento, condizente com estágios clínicos menos intensos de doença. Enfatiza-se que a avaliação da contagem diferencial de leucócitos pode variar de acordo com diferentes fatores, como a gravidade dos sinais clínicos, competência imunológica, ou presença de infecções (BRAZ et al., 2015).

A avaliação das enzimas ALT e FA, no soro, indicou um cão (nº 5) em todo o grupo com valores um pouco acima da normalidade em 6,8% e 5,7%, respectivamente. Apesar dessa alteração ser um fator de indicação de lesão hepática, esse cão apresentava histórico de inflamação osteoarticular e a guardiã fazia uso esporádico de medicamentos anti-inflamatórios esteróides o que poderia ter induzido o aumento dessas enzimas, principalmente da FA (MAYER, 1995; THRALL et al., 2014). De acordo com Thrall et al., (2014) a atividade sérica de ALT também pode aumentar durante a fase de recuperação da lesão hepática, quando existe regeneração ativa dos hepatócitos.

As transaminases são responsáveis pela metabolização das proteínas e a sua elevação na circulação ocorre quando há lesão dos hepatócitos devido a causas físicas, químicas ou microbiológicas (KANEKO et al., 2008; MONTEIRO, 2010; VIEIRA-NETO et al. 2011; THRALL et al., 2014). A FA é a enzima mais distribuída no organismo, sendo sintetizada na sua maior parte pelo fígado (VIEIRA-NETO et al., 2011). Em doenças crônicas, como no caso da LV canina, o aumento da FA sérica pode estar relacionado com lesão tecidual hepática e hepatobiliar, que libera na circulação a FA proveniente de hepatócitos ou dos ductos biliares (RIBEIRO et al. 2002). Na LV canina ativa, a lesão das células hepáticas pode ocorrer devido à presença de *Leishmanias* nos macrófagos hepáticos e ao processo inflamatório (TAFURI et al., 1996). Outros autores descrevem uma elevação sérica nos valores de enzimas hepáticas em proporções como 5% (VIEIRA NETO et al., 2011; FREITAS et al., 2012) ou 16% dos cães doentes (CIARAMELLA et al., 1997). No grupo de cães aqui avaliados, um cão (nº 10) apresentou elevação na ALT, o que parece ser devido a lesão dos hepatócitos causado por processo inflamatório que ocorre pela presença da *Leishmania*. (SILVA, 2007). Já o cão nº3 apresentou elevação nos níveis séricos de FA, o que, diante dos demais parâmetros, indica que pode ter ocorrido pela administração de drogas para o tratamento da leishmaniose.

Os valores de proteínas totais apresentaram-se acima do valor máximo em seis cães e foram bastante elevados ( $> 10\text{g/dL}$ ) em quatro cães do presente estudo. Achados de hiperproteinemia na LV canina são comuns e devem-se à intensa produção da fração imunoglobulinas (IKEDA et al., 2003; SILVA et al., 2011; BRAZ et al., 2015). Segundo Thrall et al. (2014), a maioria dos cães desenvolve gamopatia policlonal. De fato, o grupo de cães do presente estudo apresentava valores elevados de globulinas, cuja média encontrada ( $5,8 \pm 1,9\text{g/dL}$ ) atingiu o dobro dos valores de normalidade ( $2,7 - 4,4 \text{ g/dL}$ ). Nossos resultados se assemelham aos de outros autores (NIETO et al., 1992; CIARAMELLA et al., 1997; FREITAS et al., 2012). Quando avaliada a razão albumina/globulinas no grupo de cães aqui descritos, verificou-se um valor médio inferior ao valor de referência para espécie ( $0,59-1,11$ ), caracterizando a inversão. A inversão da razão albumina/globulinas na LV canina vem sendo descrita por diversos autores e deve-se à redução dos níveis de albumina em oposição ao aumento da fração gamaglobulina (CIARAMELLA et al., 1997; KANEKO et al., 2008; VIEIRA-NETO et al., 2011). A hipoalbuminemia é atribuída tanto às perdas urinárias, quanto à redução na ingestão de alimentos que ocorrem nos cães acometidos, mesmo que tratados (MEYER, 1995; THRALL et al., 2014), como no presente estudo. Cinco cães apresentaram valores normais de proteínas totais; ainda assim, o valor da razão albumina/globulinas foi inferior ao valor de referência devido à inversão dessas proteínas que é comum em cães portadores de leishmaniose (CIARAMELLA et al., 1997; REIS et al., 2006). A hiperglobulinemia estava presente em nove dentre os 11 cães avaliados, sendo tal aumento atribuído à resposta humoral, predominantemente de IgG, à estimulação antigênica pela presença do parasito, conforme descrito por outros autores (THRALL et al., 2014).

No presente estudo, os resultados da UPC mostraram que os cães avaliados apresentavam proteinúria renal, embora os valores médios ou individuais de ureia e creatinina séricos não indicassem disfunção renal. Por essa razão, esses cães foram classificados como portadores de doença leve ou discreta (estádios I ou II). Segundo as recomendações da IRIS (2016), na classificação do grau de envolvimento renal, associa-se os valores séricos de ureia e creatinina com os de proteinúria. Para Solano-Gallego et al. (2009) a doença renal crônica só é perceptível quando os néfrons tornam-se disfuncionais e 75% da função renal está comprometida em ambos os rins. Na LV canina, o principal fator fisiopatológico no acometimento renal é a deposição de imunocomplexos e presença de infiltrados inflamatórios (CIARAMELLA et al., 1997;

FERRER, 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). No presente estudo, a proteinúria detectada na maioria das amostras dos cães corrobora achados já descritos na LV canina em diferentes estágios clínicos (NIETO et al., 1992; SALGADO-FILHO, 2003; LIRA et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Os resultados de avaliação da densidade urinária dos 11 cães no momento da coleta de amostras, para estudo da farmacocinética do alopurinol, indicaram que dois deles (cães nº 8 e 9) apresentavam isostenúria (densidade urinária  $>1008$  e  $<1012$ ). Tais valores, que indicam osmolalidade urinária igual à do plasma (GARCIA-NAVARRO, 2005; GONZALEZ et al., 2008), se analisados isoladamente, poderiam sugerir que esses cães tivessem insuficiência renal primária. Diferentes autores associam achados de isostenúria à falha renal decorrente de glomerulonefrite em cães com LV ativa (MEYER et al., 1995; GARCIA-NAVARRO, 2005; LIRA et al., 2009). Entretanto, a análise conjunta com demais parâmetros dos cães 8 e 9 do presente estudo, como ureia e creatinina séricas, além de UPC urinária, mostra que não havia evidências de falha renal. Ambos os cães isostenúricos foram clinicamente classificados no estágio I de LV canina, compatível com resposta bem-sucedida ao tratamento, assim, atribuímos tal achado a aumento na ingestão de líquidos, como já discutido por outros autores para explicar o fenômeno (MEYER et al., 1995, GONZALEZ et al., 2008). Ainda dentre os achados de densidade urinária dos 11 cães do estudo, verificamos que no dia da avaliação farmacocinética do alopurinol, três cães (nº 1, 3 e 6) apresentaram valores de densidade urinária acima da normalidade (1,030). Esses valores indicam que esses cães demonstram habilidade adequada na concentração de urina para manutenção da homeostase, conforme já descrito na literatura (WILLARD et al., 2012). Cinco cães (nº 2, 4, 5, 7 e 11) apresentavam densidade urinária entre 1,013 a 1,029 o que indica que esta urina estava concentrada, mas não suficiente para considerar uma adequada função tubular renal (MEYER, 1995; LIRA et al., 2009). Os cães do presente estudo, apresentavam-se normohidratados no momento da avaliação clínica, porém a desidratação é um fator importante para a interpretação dos achados da densidade urinária. Alguns autores relatam que cães privados de água ou desidratados por outras causas, podem apresentar urina mais concentrada com densidade urinária entre 1,050 a 1,060 (GARCIA-NAVARRO, 2005; THRALL et al., 2014) o que não foi visto nesse estudo.

O pH urinário apresentou-se alcalino nas amostras de três cães (nº 3, 7 e 9) do presente estudo. Como nenhum desses animais apresentava bactérias em números

indicativos de infecção, ou outros elementos que pudessem ser associados a inflamação, como cilindúria, podemos atribuir tal achado à dieta, conforme já descrito (LIRA et al. 2009); GARCIA-NAVARRO 2005; MEYER, 1995). Outra possibilidade é a interferência do alopurinol no pH urinário, entretanto, não houve coerência entre os resultados que pudesse explicar a possibilidade de tal interferência. O grupo estudado mostrou variação de pH entre 5,5 a 9,0, oito cães apresentaram pH dentro dos valores de referência para espécie canina (5,5 – 7,5). Outros autores afirmam que terapia com drogas pode interferir no pH (GARCIA-NAVARRO, 2005), o que também resultaria no padrão de cristais urinários possivelmente encontrados (GONZÁLEZ et al., 2008; TORRES et al., 2016). Entretanto, ao examinarmos o sedimento urinário dos cães aqui descritos, verificamos que apenas um cão apresentou cristais de xantina na urina. A presença de cristais de xantina pode decorrer do uso de alopurinol, sendo considerado efeito adverso (PLEVRAKI et al., 2006; TORRES et al., 2016). O cão que apresentou cristais de xantina fazia uso da droga por 1 ano e 9 meses no dia da avaliação farmacocinética. De acordo com Lira et al., (2009), a presença de cristais na urina é um achado inespecífico na LV canina.

A frequência de cães com bilirrubinúria aqui encontrada, foi também observada no estudo realizado em cães com LV por Lira et al. (2009) que reportaram 15%. Salientamos que todos os cães avaliados no presente estudo foram machos, e que o achado de bilirrubinúria discreta em cães saudáveis é esperado (MEYER, 1995). Nos três únicos cães nos quais foi observada bilirrubinúria no presente estudo, a densidade urinária era superior a 1,020, o que torna o achado insignificante (MEYER et al. 1995).

Os achados de bacteriúria e leucocitúria nos cães nº 8 e 10 do presente estudo indicam possível infecção das vias urinárias. Como tratam-se de cães sob tratamento, as proporções de achados de hematúria, bacteriúria e leucocitúria foram muito menores do que as encontradas por autores cujo trabalho limitou-se a descrever cães com LV em diferentes condições clínicas, sem interferência de tratamento (NIETO et al., 1992; LIRA et al., 2009). Esses autores encontraram proporções de 50 a 100% de animais com hematúria, e afirmam que esses são achados frequentes tanto em cães quanto em humanos ou caninos infectados por *Leishmania*, devido ao envolvimento renal (SALGADO-FILHO et al., 2003; LIRA et al., 2009). A presença elevada de leucócitos e hemácias na urina pode sugerir processo inflamatório, mas o número de hemácias na urina pode estar dentro do limite de normalidade conforme a forma de coleta. Se a urina for coletada por cateterização, até 5 eritrócitos por campo podem ser um achado comum

(MEYER et al., 1995; GARCIA-NAVARRO et al., 2005). Um cão do nosso estudo (n° 6) apresentou bacteriúria sem leucocitúria relevante, no que consideramos contaminação durante coleta ou processamento da amostra, uma vez que a urina foi coletada por sonda uretral. A presença de bactéria na urina dos cães pode representar contaminação da amostra, uma vez que bactérias não devem estar presentes na urina, e podem aparecer quando a coleta da amostra é feita por sonda uretral ou micção natural (MEYER et al., 1995; GARCIA-NAVARRO, 2005).

Os cães do presente estudo fizeram uso de alopurinol duas vezes ao dia na dose de 10 mg/kg. Essa dose é preconizada na posologia do alopurinol como leishmanioestático, para cães, por diversos autores (DENEROLLE; BORDOISEAU, 1999; PLEVAKRI, et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Na presente investigação, as doses totais variaram entre 100-450mg devido ao peso dos animais, o que leva a variações importantes na farmacocinética do fármaco e do seu metabólito, tanto concentração máxima ( $C_{máx}$ ) quanto área sob a curva (AUC), parâmetros calculados em função da dose, logo, irão interferir nos resultados de *Clearance* e Volume de distribuição. Assim, a dose foi corrigida pelo peso, mas os dados mostram que quanto maior o peso, maior é o *clearance* e maior o Vd. Ou seja, a correção da dose por quilograma (Kg) não resulta na mesma concentração plasmática na dose múltipla porque o *clearance* está variando em função do peso, mesmo nos cães com comprometimento renal. Dessa forma o peso foi um viés de grande relevância no estudo em questão e tal aspecto deve ser investigado em próximos estudos.

De acordo com Appelbaum et al. (1982), o alopurinol pode ser incompletamente absorvido devido à sua baixa solubilidade em água e a uma taxa de dissolução lenta, ou ao metabolismo de primeira passagem no fígado. Nessas condições, existe a possibilidade do alopurinol sofrer metabolização para oxipurinol, por meio da enzima xantina oxidase presente no intestino. Assim, a cinética do alopurinol caracteriza-se como uma cinética de ordem zero, ou seja, quando a velocidade do processo é constante, independente da concentração do fármaco.

Pode-se observar que a média da concentração plasmática máxima ( $C_{máx}$ ) do alopurinol, atingida nos cães do presente estudo, foi de  $6,00 \pm 1,78 \mu\text{g/mL}$  num tempo máximo ( $T_{máx}$ ) de  $1,5 \pm 0,67$  horas. Nossos dados são semelhantes à investigação de LING et al. (1997), que reportaram valores de  $C_{máx} = 6,43 \mu\text{g/mL}$  e  $T_{máx} = 1,9\text{h}$ , porém em cães dálmatas saudáveis. Além disso, a AUC nas análises do alopurinol na presente investigação foi de  $27,20 \pm 7,8 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ . A meia-vida de eliminação do alopurinol,



obtida no presente estudo em cães portadores de LV, foi em média  $t_{1/2} = 2,81 \pm 1,29$  horas, sendo a constante de eliminação  $Kel = 0,31 \pm 0,17 \text{ h}^{-1}$ . Nossos achados foram semelhantes aos achados de Ling, et al., (1997), que obtiveram  $t_{1/2} = 2,69 \text{ h}$  e  $Kel = 0,26 \text{ h}^{-1}$  em cães de ambos os sexos, dálmatas, saudáveis.

Os valores encontrados na análise do oxipurinol no plasma de cães indicaram  $C_{\text{máx}}$  de  $3,08 \pm 0,68 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{\text{máx}} = 5,9 \pm 3,6 \text{ h}$  e  $AUC = 33,87 \pm 13,1 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ . Os dados que obtivemos sobre a farmacocinética do oxipurinol em cães portadores de leishmaniose são apresentados pela primeira vez na literatura.

Vale ressaltar que não foi possível mensurar a meia-vida do metabólito oxipurinol nos cães do presente estudo, uma vez que não houve redução significativa das concentrações plasmáticas no intervalo de coleta desta investigação (**Figura 13**), para que se fizesse o cálculo da meia-vida. Assim, podemos considerar que a meia-vida do oxipurinol em cães sob tratamento de LV é longa, semelhante à que já foi descrita em estudos em humanos, os quais determinaram valores de  $t_{1/2} = 13\text{-}30$  horas (GUERRA et al., 2001, DAY et al., 2007; REINDERS et al., 2007).

O volume de distribuição aparente ( $V_d$ ), parâmetro que mede a distribuição do fármaco no organismo, apresentou-se média de  $V_d = 1,37 \pm 0,83 \text{ L/Kg}$  de alopurinol nos cães do presente estudo. Novamente, nossos dados equiparam-se aos verificados anteriormente sobre a farmacocinética do alopurinol em cães Dálmatas saudáveis, nos quais o  $V_d$  encontrado foi de  $1,17 \text{ L/Kg}$  (LING, et al., 1997). Consideramos, portanto, que nos cães que estudamos, de padrões raciais variados e portadores de leishmaniose visceral, a droga foi bem distribuída pelos tecidos, achado que equivale aos reportados para alopurinol em humanos por Murrell e Rapeport, (1986).

A albumina é a proteína que possui maior concentração no soro, cerca de 50%, logo uma das suas funções é manter a pressão coloidosmótica do plasma, mas também atua como proteína de transporte de substâncias orgânicas e medicamentos (SANTOS et al., 2004; VIEIRA-NETO et al., 2011). Porém os valores reduzidos de albumina em alguns cães do estudo, não interfere na distribuição do fármaco e seu metabólito no organismo devido à baixa ligação do alopurinol a proteínas plasmática (ELION, 1966; MURRELL; RAPEPORT, 1986; SANDOZ, 2014).

De acordo com a literatura, a principal via de eliminação é a renal sendo 80% para o metabólito e 10-30% para o fármaco inalterado (MURRELL; RAPEPORT 1986; DAY et al., 2007; WRIGHT et al., 2013) assim, o *clearance* para o alopurinol no presente

estudo foi de  $0,35 \pm 0,11$  L/h/Kg dados que corroboram com os achados de Ling et al., (1997).

Os dados de  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $Cl$ ,  $V_d$  e  $K_{el}$  do cão de número 9 foram excluídos dos cálculos de médias dos dados apresentados acima. Esse animal apresentou o valor de  $AUC=52,26$  h\* $\mu$ g/mL, muito diferente dos demais, e muito elevado, conseqüentemente um menor  $Cl = 0,17$ L/h, quando comparado ao grupo. Alguns fatores, como inibição enzimática própria desse cão, ou a possibilidade de ele ser um metabolizador lento, poderiam explicar esse aumento. Entretanto, a maior parte dos parâmetros clínicos e de patologia clínica avaliados nesse cão encontravam-se dentro dos valores de referência de normalidade para cães, e seu estadiamento clínico de LV foi determinado em I embora o animal apresentasse isostenúria. Ainda assim, o fato desse animal apresentar um pH urinário alcalino (pH= 9,0; VR = 5,5-7,5) pode justificar o aumento do parâmetro AUC e diminuição de  $Cl$ . Nesse caso, mesmo havendo uma eliminação renal do alopurinol inalterado de aproximadamente 10% apenas, com um  $pK_a$  em torno de 9,4, espera-se um aumento na reabsorção e diminuição da excreção do alopurinol em um pH urinário de 9,0. Esse fenômeno pode levar à diminuição do *Clearance* e o aumento do AUC da droga, fato que pode justificar a grande diferença entre o cão 9 e os demais cães do grupo.

Dessa forma, o presente estudo retrata a farmacocinética do alopurinol e oxipurinol em cães de diferentes raças, idades e pesos, com leishmaniose naturalmente adquirida. Ressaltamos que a maior parte dos animais investigados se encontravam nos estágios I e II da doença, ou seja, nas fases mais brandas da doença, e atribuímos esse aspecto ao que se espera de cães sob tratamento para a doença natural, ou seja, em remissão dos aspectos mais graves de LV canina. Ainda assim, muitos dos elementos apresentados nos exames de patologia clínica do grupo estudados e sob tratamento, guardavam equivalência com os achados de diversos autores, ao caracterizarem a leishmaniose visceral canina. Podemos afirmar que os valores indicativos de farmacocinética do alopurinol nos cães com LV estágios I e II equiparam-se aos parâmetros farmacocinéticos do alopurinol em cães sadios da raça dálmata, conforme anteriormente descritos por Ling, et al., (1997). Em relação a dose, esta deverá ser avaliada em animais com comprometimento renal significativo, como reportado para humano (Day et al., 2007).

## 8. CONCLUSÕES

- O método de HPLC-UV, aplicado na avaliação do plasma em cães apresentou-se sensível, robusto e reprodutivo para os estudos com aplicabilidade em farmacocinética.

- A farmacocinética do alopurinol e oxipurinol foi pela primeira vez investigada em cães portadores de leishmaniose visceral naturalmente adquirida. Nos cães em estágio I e II da doença, ou estabilizados em relação a doença, o presente estudo mostrou que a farmacocinética do alopurinol foi semelhante aos dados de farmacocinética em cães saudáveis, apesar do viés peso, que gerou alterações significantes em termos de Cl e Vd dentro do grupo.

- Estudos com cães em estágios III e IV de LV são necessários para avaliar se há alterações quanto à absorção, distribuição, metabolismo e excreção do alopurinol e seu metabólito oxipurinol em fases mais avançadas da doença, em que é esperado um maior comprometimento das funções orgânicas.

- A avaliação da urina ainda se encontra em análise, e os resultados deverão acrescentar mais dados sobre o comportamento do metabólito oxipurinol.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU-SILVA, A.L.; LIMA, T. B.; MACEDO, A. A.; MORAES-JÚNIOR, F. J.; DIAS, E. L.; BATISTA, Z. S.; CALABRESE, K. S.; MORAES, J. L. P.; REBÊLO, J. M. M.; GUERRA, R. M. S. N. C. Soro prevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotômíneos em uma área endêmica na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.17, p. 197-203, 2008.
2. AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D. V. V.; COSTA, R. L. G.; JULIÃO, F. S.; SANTOS, W. L. C.; BARROUIN-MELO, S. M. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**. v.8, n.4, p. 283-294, 2007.
3. ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**. n. 127. p. 227-232, 2005.
4. ALPPELBAUM, S. J., MAYERSOHN, M., DORR, R. T., PERRIER, D. Allopurinol Kinetics and Bioavailability Intravenous, Oral and Rectal Administration. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. n.8, 1982.
5. ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**. v.57, p.1-88, 2004.
6. ANDRADE, S. F. Manual de Terapêutica Veterinária. 3ed. Roca, São Paulo, p. 347. 2008.
7. AMUSATEGUI, I. Tratamiento de la leishmaniosis canina: valoración, caracterización y comparación de la respuesta a distintos protocolos a base de antimoniato de meglumine (asociado o no a alopurinol). **Universidad Complutense de Madrid**. 328p. 1998.
8. AMUSATEGUI, I.; SANZ, A.; RODRÍGUEZ, F.; TESOURO, M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of epidemiology**. v.18, p. 147-156, 2003.
9. ARIZA, P. C. Epidemiologia da urolitíase de cães e gatos. Seminário Universidade Federal de Goiás. 2012.
10. BANETH, G., KOUTINAS, A. F., SOLANO-GALLEGO, L., BOURDEAU, P., FERRER, L. Canine Leishmaniosis – new concepts and insight on in expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**. v.24, n.7. 2008.

11. BARROUIN-MELO, S.M.; LARANGEIRA, D.F.; TRIGO, J.; AGUIAR, P.H.P.; DOS-SANTOS, W.L.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V.99, n.2, p. 195-197, 2004.
12. BARTGES, J. W.; OSBORNE, C. A.; FELICE, L. J.; KOEHLER, L. A.; ULRICH, L. K.; BIRD, K. A.; CHEN, M.; SAWCHUK, R. J. Bioavailability and pharmacokinetics of intravenously and orally administered allopurinol in healthy beagles. **Am J Vet Res**. v.58, n. 5, p. 504-510, 1997a.
13. BARTGES, J. W.; OSBORNE, C. A.; FELICE, L. J.; KOEHLER, L. A.; ULRICH, L. K.; BIRD, K. A.; CHEN, M.; SAWCHUK, R. J. Influence of two diets on pharmacokinetic parameters of allopurinol and oxypurinol in healthy beagles. **Am J Vet Res**. v.58, n. 5, p. 511-5, 1997b.
14. BRASIL SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 122p, 2006.
15. BRASIL SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Doenças Infeciosas e Parasitárias** Brasília: Ministério da Saúde, 444p, 2010.
16. BRATH, E.; MIKO, I.; NEMETH, N.; KOVACKS, J.; PETO, K.; FURKA, I. Effects of allopurinol and preconditioning on apoptosis due to ischemia-reperfusion on a double jejunum-segment canine model. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 26, n. 3, 186-193, 2011.
17. BRAZ, P.H.; SARTORETTO, M.C.; SOUZA, A.S. de; Melo, F.M.G. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania spp*. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.1, p.87-90, 2015
18. CAMARGO, J. B.; TRONCARELLI, M. Z.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, n.71, P. 86-92, 2007.
19. CAVALIERO, T.; ARNOLD. P.; MATHIS. A.; GLAUS. T.; HOFMANN-LEHAMANN. R.; DEPLAZES. P. Clinical, Serologic and Parasitologic Follow Up after Long-Term Allopurinol Therapy of Dogs Naturally infected with *Leishmania infantum*. **J Vet Intern Med**. p. 330-334. 1999.
20. CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONE, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**. v. 141, p. 539-543, 1997.

21. CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. **Small animals/exotics**.v.25, n.5, p. 358-369, 2003.
22. COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S. M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, N. M. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**. v. 174, p. 636-643, 2007.
23. DAY, R. O. BIRKETT, D. J. HICKS, M. MINERS, J. O. GRAHM, G. G. BROOKS, P. M. New uses for allopurinol. **Drugs**. v.38, n. 3, 339-344, 1994.
24. DAY, R. O.; GRAHAM, G.G.; HICKS, M.; McLACHLAN, A. J.; STOCKER, S. L.; WILLIAMS, K. M. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of allopurinol and oxypurinol. **Clin Pharmacokinet**. v. 46, p. 623 -644, 2007.
25. DENEROLLE, P.; BOURDOISEAU. G. Combination Allopurinol and Antimony Treatment versus Antimony Alone and Allopurinol Alone in the Treatment of Canine Leishmaniasis (96 Cases). **J Vet Intern. Med**. v.13, p. 413-415, 1999.
26. ELION, G.B.; KOVENSKY, A.; HRRCHINGS, H. Metabolic studies of alopurinol, na inhibitor of xanthine oxidase. **Biochemical Pharmacology**. v.15, p.863-880, 1966.
27. ELION, G.B. The quest for a cure. **Anna Rev. Pharmacol. Toxicol**. v. 33, p. 1-23, 1993.
28. FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Records**. v. 136, p. 514-516. 1995.
29. FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Bcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: **Hoeschst Roussel Vet**. p. 6-10. 1999.
30. FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. A.; NASCIMENTO, L. D.; ABRANTES, R. T.; MOUTA-CONFORT, E.; PASSOS, S. R. L.; SCHUBACH. Canine visceral *leishmania*: Study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. **Revista do Instituto Medicina Tropical**. v. 52. p. 193-196, 2010.
31. FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; NETO, B. E. L.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally-infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.45, n.1, p. 24-29, 2012.
32. GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO Jr., F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de flebotómíneos (Diptera: Psycodidae) em foco de

- leishmaniose no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 31, n.4, p. 378-90, 1997.
33. GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de Urinálise Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Livraria Varela, 95p. 2005.
  34. GINEL, P. J.; LUCENA, R.; LÓPEZ, R.; MOLLEDA, J. M. Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 39, p. 271-274. 1998.
  35. GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
  36. GONZÁLEZ, F. H.D.; SILVA S. C. Patologia Clínica Veterinária- Texto Introdutório. UFRGS, 327p, 2008.
  37. GRAHAM, S.; DAY, R. O.; WONG, H.; McLACHLAN, A. J.; BERGENDAL, L.; MINERS, J. O.; BIRKETT, D. J. Pharmacodynamics of oxipurinol after administration of allopurinol to healthy subjects. **Br J Clin Pharmacol**. v. 41, p. 209-304, 1996.
  38. GUERRA, P.; FRIAS, J.; RUIZ, B.; SOTO, A.; CARCAS, A.; GOVANTES, C.; MONTUENGA, C.; FERNÁNDEZ, A. Bioequivalence of allopurinol and its metabolite oxipurinol in two tablet formulations. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. v. 26, p. 113 – 119, 2001.
  39. IKEDA, F. A.; CIARLINI, P. C.; FEITOSA, M. M.; GONÇALVES, M. E.; LUVIZOTTO, M. C. R.; LIMA, V. M. F. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**. n. 8, p. 42-48, 2003.
  40. IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 34-42, 2007.
  41. IKEDA-GARCIA, F. A.; CIARLINI, P.C.; LOPES, R. S.; MARQUES, F. J.; BOMFIM, S. R. M.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; MARCONDES, M. Hematological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 45, p. 68-74, 2008.
  42. IRIS, 2016. IRIS staging of (CKD) chronic kidney disease (modified 2015) (International Renal Interest Society. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/pdf/staging-of-ckd.pdf>. Acesso 13/07/2016.
  43. JULIAO, F.S.; SOUSA, B.M.P.S.; FREITAS, D.S.; OLIVEIRA, L.S.; LARANGEIRA, D.F.; DIAS-LIMA, A.G.; SOUZA, V.M.M.; BARROUIN-

- MELO, S.M, MOREIRA, Jr.E.D.; PAULE, B.J.A & FRANKE, C.R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 27, n.8, p. 319-324, agosto de 2007.
44. LIMA, E.B.; MOTTA, J. O. C.; PORTO, C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **An. Bras. Dermatol.** v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.
45. LING, G. V.; CASE, L. C.; NELSON, H.; HARROLD, D. R.; JOHNSON, D. L.; VULLIET, P. R. Pharmacokinetics of allopurinol in Dalmatian dogs. **J. Vet. Pharmacol. Therap.** v. 20. P. 134 – 138, 1997.
46. LIRA, N. M. S.; PIMENTEL, D. S.; RAMOS, R. A. N.; ALEXANDRE, L. M. D. FAUSTINO, M. A. G.; PEIXOTO, R. M.; MOTA, R. A.; ALVES, L.C. Aspectos físicos, químicos e microbiológicos de urina de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Medicina Veterinária**. v. 3, n.1, p. 11-17, 2009.
47. KAMAU, S. W.; NUNEZ, R.; GRIMM, F. Flow cytometry analysis of the effect of alopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. **BMC Pharmacology**. v.1, n.1, p. 1-10, 2001.
48. KANEKO, J.J., HARVEY J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6th ed. Burlington: Academic Press, 896p. 2008.
49. KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta do Sul, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**. v. 37, n. 3. p. 907-910, 2007.
50. MACHADO. J. G.; HOFFMANN. J. L; LANGONI. H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, n. 71, p. 50-58, 2007.
51. MADDISON, E. J. PAGE, S. W. CHUR, D. B. **Farmacologia clínica de pequenos animais**. Editora. Saunders Elsevier. 2ed. 578p. 2010.
52. MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**. n.158. p. 274–287, 2008.
53. MAIA, C.; NUNES, M.; MARQUES, M.; HENRIQUES, S.; ROLÃO, N.; CAMPINO, L. In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. **Experimental Parasitology**. v. 135, p. 36-41, 2013.
54. MANCIANTI, F.; FALCONE, M. L.; GIANNELLI, C.; POLI, A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble



- Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology** n.59, p.13-21. 1995.
55. MARR, J. J.; BERENS, R.L.; NELSON D. J. Antrypansomal effect of allopurinol: Conversion in vivo to aminopyrazolopyrimidine nucleotides by *Trypanosoma cruzi*. **Science**. v.201, p. 1018-1020, 1978.
  56. MARR, J. J. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. **J. Lab. Clin. Med.** n. 118, p. 111-119, 1991.
  57. MARTINEZ, S.; MARR, J. Allopurinol in the treatment of american cutaneous leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**. v. 326, n. 11, p. 741-744, 1992.
  - 58.
  59. MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de Laboratório Veterinária: Interpretação e Diagnóstico**. São Paulo: Roca. 308p.1995.
  60. MICHALSKY, É. M.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. C. V. M. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, Á. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**. v. 147, p. 67-76, 2007.
  61. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica Conjunta nº 1, de 2011**. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública; 2011.
  62. MONTEIRO, A. R. P. Estudo epidemiológico da leishmaniose canina na Zona da Arrábida. Dissertação (Mestrado). Universidade Lusófona DE Humanidades e Tecnologias. 2010.
  63. MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R, GARCIA, J.F, CORBETT, C. E. P.; LAURENTI. Comparacion of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary parasitology**. n. 145, p. 245-252, 2007.
  64. MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. **Lancet**. v. 306, p.1561-77, 2005.
  65. MURREL, G. A.; RAPEPORT, W. G. Clinical Pharmacokinetics of allopurinol. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 11, p. 343-353, 1986.
  66. NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro, p. 695, 2010.

67. NERY, G. Estudo prospectivo de resposta a protocolo terapêutico para tratamento da leishmaniose visceral canina: evolução clínica, sorologia, parasitismo e infectividade ao vetor. 2015. 110f. (**Mestrado em Saúde Animal**) Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia.
68. NERY, G. MENESES, I. D. S. TRUEB, I. LARANGEIRA, D. F. BARROUIN-MELO, S. M. Ocorrência de *Leishmania infantum* em fezes de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 36, n.5, p. 1249-1253, 2015.
69. NIETO, C.G.; NAVARRETE. I. HABELA, M. A.; SERRANO, F.; REDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Veterinary parasitology**. n. 45, p. 33-47, 1992.
70. NOLI. C.; AUXILIA. S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**. n. 16. p. 213 – 232, 2005.
71. ORTEGA, M.; LLORET, A.; ROURA, X. Hidronefrosis por Cálculos Renales de Xantina em um Teckel tratado com alopurinol. **Congresso Nacional de AVEPA**. p. 276, 2008.
72. PFALLER, M. A.; MARR, J. J. Antileishmanial Effect of Allopurinol. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. v. 5, n. 5, p. 469 -472, 1974.
73. PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNARDINA, W.; REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun**. v. 62, p. 229–235, 1994.
74. PLEVRAKI, K.; KOUTINAS, A. F.; KALDRYMIDOU, H.; ROUMPIES, N.; PAPAZOGLU, L. G.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; SAVVAS, I.; LEONDIDES, L. Effects of Allopurinol Treatment on the Progression of Chronic Nephritis in Canine Leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **J. Vet Inter Med**. v. 20, p. 228-233, 2006. REGUERA, R. M.; MORÁN, M.; PÉREZ-PARTEJO, Y; GARCÍA-ESTRADA, C.; BALAÑA-FOUCE, R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v.227, p. 98-114, 2016.
75. REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**. v. 81, p. 68-75, 2006.
76. REINDERS, M. K.; NIJDAM, L. C.; VAN ROON, E. N.; MOVIG, K. L.; JANSEN, T. L.; VAN DE LAAR, M. A.; BROUWERS, J. R.; A simple method

for quantification of alopurinol and oxipurinol in human sérum by high-performance liquid chromatography with UV- detection. **J. Pharm Biomed Anal.** v.45, n.2, p. 312-7, 2007.

77. RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JAFFE, C. L. Analysis of immune responses in dogs with canine leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Veterinary Immunology and Immunopatology.** v. 71, p. 69-76, 1999.
78. RIBEIRO, V. M. Padrão histológico e infectividade da pele de cães com leishmaniose visceral antes e durante o tratamento com antimoniato de n-metil glucamina e alopurinol. XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, VI Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, Programa e Resumos, Uberaba-MG, 2002.
79. RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Revista Clínica Veterinária,** n. 71, p. 66-76, 2007.
80. RIBEIRO, R. R.; SILVA, S. M.; FULGÊNCIO, G. O.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARD, F. J. G. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.22, n.3, p. 373-378, 2013.
81. SALGADO-FILHO, N. FERREIRA, T. M. A. F.; COSTA, J. M. L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.36, n.2, p. 217-221, 2003.
82. SANDOZ. Sandoz do Brasil Industria Farmacêutica Ltda. **Alopurinol.** p. 1-12, 2014. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7935722014&pIdAnexo=2216412](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7935722014&pIdAnexo=2216412). Acesso em 20.07.16.
83. SANTOS, N. S. J. DRIBE, S. A. KAMIMURA, M. A. CUPPARI, L. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Comunication.** v.3, n. 17, p, 339-349, 2004.
84. SHAPIRO, T.A.; WERE, J. B. O.; DANSO, K.; NELSON, D. J.; DESJARDINS, R. E.; PAMPLIN, C. L. Pharmacokinetics and metabolism of alopurinol riboside. **Clin Pharmacol Ther.** v.49, p. 506-14, 1991.
85. SILVA, S. M. Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937), submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de belo horizonte. 2007a. 133p. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas **da Universidade Federal de Minas Gerais.**
86. SILVA, S. F. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica- Ciências Agrárias e Biológicas.** v.1, n.1, p. 20-31, 2007b.

87. SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. 165, p. 1-18, 2009.
88. SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**.v. 4, p. 1-16, 2011.
89. SOUZA, C.; BORASCHI, S.; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 44-48, 2007.
90. TAFURI, W. L.; BARBOSA, A. J. A.; MICHALICK, M. S. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo, v. 38, n.2, p. 81-89. 1996.
91. TASCA, K. I.; BUZETTI, W. A. S.; TENORIO, M. S.; PAULAN, S.C.; LIMA, F. L.; QUEIROZ, M. G. P.; OLIVEIRA, T. M. F.; NEVES, M. F.; NORONHA-JR, A. C. F.; ASSIS, J. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2009.
92. THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo. Ed. Roca. p. 376-390, 2014.
93. TORRES, M.; PASTOR, J.; ROURA, X.; TABAR, M. D.; ESPADA, Y.; FONT, A.; BALASCH, J.; PLANELLAS, M. Adverse Urinary Effects of Allopurinol in Dogs with Leishmaniasis. **J Small Anim Pract**. v.57, n. 6. P. 299 -304. 2016.
94. VIEIRA-NETO, F. A.; SOUSA, A. K. S.; MARQUES, M. V.; ARRUDA, D. S. SILVA, L. A. Avaliação de parâmetros bioquímicos em cães infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista Ciência Saúde**. v. 13, n.2, p. 131-140, 2011.
95. ZAGNONI, P. G.; BIANCHI, A.; ZOLO, P. Allopurinol as na add-on therapy in refractory epilepsy – a double- blind placebo- com- trolled randomised study. **Epilepsia**. n.35, p. 107 -12, 1994.
96. WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G.H. Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. 5 ed. Philadelphia: Saunders Company, 377 p., 2012.

97. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the Leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010.
  
98. WRIGHT, D. F. B.; STAMP, L. K.; MERRIMAN, T. R.; BARCLAY, M. L.; DUFFULL, S. B.; HOLFORD, N. H. G. The population pharmacokinetics of allopurinol and oxypurinol in patients with gout. **Eur J Clin Pharmacol.** v. 69, p. 1411–1421, 2013.

## ANEXOS

Anexo1: Resultado da urinálise de todos os cães do estudo

Animais/ Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Volume</b>	5,0	10,0	8,0	10,0	10,0	7,0	8,5	8,5	11,5	11,0	10,0
<b>Cor</b>	Amarelo citrino	Amarelo claro	Amarelo ouro	Amarelo citrino	Amarelo citrino	Amarelo ouro	Amarelo	Amarelo claro	Amarelo palha	Amarelo claro	Amarelo claro
<b>Aspecto</b>	Límpido	Límpido	Ligeiramente turvo	Ligeiramente turvo	Límpido	Turvo	Límpido	Ligeiramente turvo	Límpido	Ligeiramente turvo	Límpido
<b>*Densidade</b>	1,044	1,020	1,036	1,020	1,026	1,044	1,014	1,010	1,010	1,030	1,020
<b>*Proteína total</b>	(+++)	(+)	(+)	(+)	(++)	Traços	Ausente	Ausente	Ausente	(++)	(+++)
<b>*pH</b>	6,0	5,5	8,0	7,0	6,0	6,0	8,0	6,5	9,0	6,0	7,5
<b>C. Cetônico</b>	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
<b>*Bilirrubina</b>	Ausente	Ausente	Traços	Ausente	(+)	(+)	(+)	Ausente	Ausente	(+)	Ausente
<b>Glicose</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Urobilinogênio</b>	Traços	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Ausente	Ausente	Ausente	Normal	Ausente
<b>Sangue</b>	Ausente	(+)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Leucócitos</b>	Raríssimo	0-3/campo	Raros	Ausentes	3-6/campo	Raros	Ausentes	Numerosos	0-2/campo	10-15/campo	3-5/campo
<b>Hemácias</b>	Ausentes	3-5/campo	Ausentes	Ausentes	2-3/campo	Ausentes	Raras	0-4/campo	Ausentes	Raras	0-2/campo
<b>Bactérias</b>	(+)	(+)	Raras	(+)	(+)	(++++)	Ausentes	(+++)	Raras	(++)	Ausentes
<b>*Células</b>	Transição Raras	Transição (++)	(+)	(+)	Epitelial raras	Transição (+)	Pélvica (+) Transição (++)	Transição (+)	Descamação (+) Transição (++)	Transição e Pelve (+)	Vesicais (+)
<b>*Cilindros</b>	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Granulócitos raríssimos	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
<b>*Cristais</b>	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Urato de amônio (raros)	<b>Xantina (+)</b>	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Amorfos (+)	Ausentes
<b>SPTZ</b>	Ausentes	Ausentes	Ausentes	(++)	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	(+++)
<b>Muco</b>	(+)	Ausente	Raro	(+)	(++)	(+++)	Ausente	Ausente	Ausente	(++)	Ausente
<b>Gotículas gordura</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	(+)	Ausente	Ausente	Ausente	(+)

**Anexo 2:** Perfil hematológico de cães naturalmente infectado com *Leishmania infantum* em uso contínuo de alopurinol.

Índices hematológicos	Cães											VR
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Eritrócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)	7,7	<b>3,65</b>	6,94	7,8	6,68	5,7	7,0	6,3	7,4	7,3	<b>4,52</b>	5,5-8,5
Hemoglobina (g/dL)	15,3	<b>8,0</b>	14,3	16,1	13,8	<b>11,7</b>	16,4	15,4	17,3	13,2	<b>9,2</b>	12-18
Hematócrito (%)	47	<b>22,8</b>	43	46,9	41,5	37	49,0	45,0	51,0	43,0	<b>28,3</b>	37-55
VGM (fl)	61,4	62,5	61,9	60,1	62	65	70	71,2	69,4	59	62,6	60-77
CHCM (%)	32,6	35,1	32,2	34,3	33,3	32,0	33,5	34,1	33,9	<b>31,0</b>	32,5	32-36
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)	8.2	11.1	8.2	10.2	14.0	11.8	7.1	12.4	12.9	10.4	<b>2.4</b>	6.0-17.0
Neutrófilos Bastonetes (μL)	0	0	164	102	0	0	0	124	0	0	48	0-300
Neutrófilos segmentados (μL)	<b>2,870</b>	6,771	5,74	7,446	7,140	9,440	3,337	7,812	6,966	8,320	<b>1,056</b>	3,000-11,500
Linfócitos (μL)	4,674	2,109	1,886	1,326	4,480	1,298	2,556	3,348	1,935	1,664	1,008	1,000-4,800
Monócitos (μL)	574	555	328	510	700	472	497	248	774	208	<b>144</b>	150-1,350
Eosinófilos (μL)	<b>82</b>	<b>1,554</b>	<b>82</b>	816	<b>1,680</b>	590	2,556	868	3,225	208	144	100-1,250
Basófilos (μL)	0	111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Raros
PPT*(g/dL)	> <b>12</b>	<b>9,2</b>	<b>10,4</b>	8,0	7,0	<b>12,0</b>	7,0	6,8	7,0	<b>9,1</b>	<b>10,8</b>	7,0-8,0
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	204	**	<b>115</b>	328	246	550	250	334	294	385	**	166-575

\*Proteína plasmática total

(KANEKO et al., 2008)

\* \*Não foi possível a contagem de plaquetas

\_ não realizaram exames

**Anexo 3** - Bioquímica sérica de cada cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum*.

Bioquímica Sérica	Cães											VR
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
ALT (UI/L)	41	17	22	38	<b>78</b>	34	41	29	17	<b>108</b>	68	15-73
FA (U/L)	33	149	<b>207</b>	107	<b>165</b>	41	52	49	82	141	–	20-156
Uréia (mg/dL)	55,0	47,7	32,3	27,7	33,5	48,4	26	21	21	46,0	–	21,4-59,9
Creatinina (mg/dL)	1,2	1,3	1,1	0,9	0,9	1,3	0,9	1,1	1,1	1,1	0,9	0,5-1,5
PTN* (g/dL)	<b>12,7</b>	<b>8,8</b>	6,9	<b>7,9</b>	6,3	<b>9,8</b>	6,7	5,8	6,7	7,1	<b>8,2</b>	5,4-7,1
Albumina (g/dL)	<b>2,4</b>	<b>1,3</b>	<b>1,9</b>	2,8	<b>1,6</b>	2,6	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>2,3</b>	<b>2,2</b>	<b>1,5</b>	2,6-3,3
Globulinas (g/dL)	<b>10,3</b>	<b>7,5</b>	<b>5,0</b>	<b>5,1</b>	<b>4,7</b>	<b>7,2</b>	<b>4,7</b>	3,8	4,4	<b>4,9</b>	<b>6,7</b>	2,7-4,4
A/G	<b>0,23</b>	<b>0,17</b>	<b>0,38</b>	<b>0,55</b>	<b>0,34</b>	<b>0,36</b>	<b>0,43</b>	0,53	0,52	<b>0,45</b>	<b>0,22</b>	0,59 – 1,11

\*Proteínas sérica totais (KANEKO et al., 2008)

ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina;

A/G: Razão albumina/ globulina



## Anexo 4



**Universidade Federal da Bahia**  
**Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

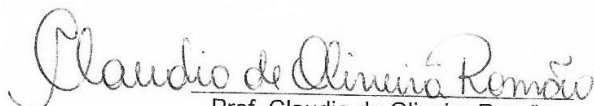
Av. Ademar de Barros, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA  
 Fone: (071) 3283-6704/6708/ - Fax: 3283-6718  
 E-mail: [escmev@ufba.br](mailto:escmev@ufba.br)

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Farmacocinética do alopurinol em cães sob tratamento para leishmaniose visceral", registrada com o nº 34/2016, sob a responsabilidade de Stella Maria Barrouin, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, em reunião de 18.07.2016.

Finalidade	( ) Ensino/Treinamento (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	24/02/2015 à 24/02/2017
Espécie/linhagem/raça	Canina ( <i>Canis lupus familiaris</i> )
Nº de animais	100
Peso/Idade	10 à 45 Kg / Variada
Sexo	Machos
Origem	Animais de companhia e domiciliados com seus responsáveis, em área endêmica para a LV.

Salvador, 01/08/2016.

  
 Prof. Claudio de Oliveira Romão  
 Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA