



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

IMPACTO DE UM PROTOCOLO DE OZONOTERAPIA NOS VALORES ANALÍTICOS DE CÃES COM LEISHMANIOSE

Dissertação apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada por Professor Doutor Vinicius Ricardo de Souza Cuña e Doutora Verónica Cristina Baião Martins Romão.

Sara Nunes Mestre, nº 21802008

2025

www.ulusofona.pt



U N I V E R S I D A D E

LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

IMPACTO DE UM PROTOCOLO DE OZONOTERAPIA NOS VALORES ANALÍTICOS DE CÃES COM LEISHMANIOSE

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, no dia 14/01/2025, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 03/2025, de 3 de Janeiro, com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor Pedro Faísca

Arguente: Professora Doutora Ana Munhoz (FMV-ULusófona)

Orientador: Professor Doutor Vinicius Souza

Este trabalho também foi orientado por Doutora Verónica Romão.

Sara Nunes Mestre, nº 21802008

2025

www.ulusofona.pt

Leva na tua memória, para o resto da tua vida as coisas boas que surgiram das dificuldades. Elas serão uma prova da tua capacidade e dar-te-ão confiança diante qualquer obstáculo.

-Paulo Coelho

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Lusófona, em especial à Faculdade de Medicina Veterinária por ter sido a minha casa nos últimos 6 anos. Obrigada a todo o corpo docente, secretariado e direção do curso por todas as oportunidades que sempre nos proporcionam ao longo de todo o curso, incluindo a possibilidade do desenvolvimento deste estudo.

Ao professor Vinicius, um grande obrigada, não só na elaboração desta tese e toda a paciência e cuidado que teve comigo, e tudo o que fez para o nosso projeto acontecer, mas também por tudo o que me ensinou ao longo do curso. Obrigada principalmente por me ter apresentado à Medicina Integrativa e me ter ensinado que há sempre mais a fazer pelos animais. É sempre um prazer aprender consigo.

À 2M Pharma, agradeço por toda a vossa disponibilidade em ajudar no desenvolvimento desta tese, em especial à minha co-orientadora Dra. Verónica Martins, que foi fundamental para a realização deste projeto. Obrigada por toda a disponibilidade e paciência.

Obrigada às instituições e clínicas que participaram neste estudo e o tornaram possível, bem como aos meus amigos que me ajudaram participando neste projeto.

À clínica Bатуca Vet, obrigada por me acolherem para o meu estágio curricular, não poderia ter tido uma melhor experiência. Obrigada à Dra. Susana por me abrir novamente portas à sua casa, 7 anos depois do nosso primeiro encontro. Obrigada a todas as doutoras por tudo o que me ensinaram, irei para sempre levar um pouco de vocês comigo não só na minha vida profissional, mas também na minha vida pessoal. A todas as enfermeiras que sempre puxaram por mim e tanto me ensinaram, e a todas as auxiliares que orientaram e animaram sempre os meus dias.

Obrigada à minha família por acharem sempre que eu era a melhor aluna da turma, ainda que não fosse. Aos meus pais obrigada por tudo o que fazem por mim, não seria quem sou hoje se não fosse pelo amor que vocês me dão. Que um dia eu vos possa dar tudo o que vocês me deram.

Ao meu namorado, obrigada por seres a minha casa. Não tinha chegado aqui sem o teu apoio nas horas mais apertadas. Obrigada por teres sempre orgulho em mim, por o dizeres mil vezes ao dia e por me fazeres ter orgulho em mim também. Daqui até à lua.

Às minhas manas de coração Tatiana e Lena, obrigada por não me abandonarem nunca e por crescerem comigo. A todos os meus amigos Cátia, Tiago, Rita, Ju, Aregados e

1008, obrigada por me animarem sempre, os anos passam e nós não mudamos. Obrigada por todas as memórias.

Às minhas amigas da faculdade e o melhor que daqui levo. Às minhas primeiras amigas Bia, Maria e Tiffa, que bom foi passar estes anos convosco e criar tantas memórias juntas, desde o dia um até hoje, quem diria. Às minhas irmãzinhas Marta e Carol, obrigada por me aturarem estes anos todos, me puxarem sempre a dar o meu melhor, que bom é brilharmos juntas. À Vi, apresentadas pela Marta no Starbucks forçado e agora juntas para sempre. Às minhas aquisições mais tardias e igualmente tão importantes, Mafalda e Rita, a vida convosco é sempre mais leve. Obrigada a todas por mudarem a minha vida e terem sobrevivido comigo a esta aventura. Que eu possa estar para sempre nas vossas vidas a aplaudir todas as vossas conquistas.

À praxe de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona. A todas as pessoas que eu aqui conheci e respeito, a quem me ensinou o básico e mais verdadeiro facto sobre este curso "Nunca se faz sozinho". Especial obrigada à minha grande parceira de aventuras e fofocas Inês, à minha madrinha a mais linda de todas Catarina, e a todos os membros com quem partilhei a honra de estar no Conselho de Veteranos. Seremos sempre nós.

Por último obrigada às minhas cadelinhas. Ao meu primeiro amor de quatro patas, a minha Maia, Mónica, Miquinhas. A principal razão que me fez inscrever neste curso foi descobrir como é possível amar tanto um ser de uma espécie diferente, foste tu quem me ensinou. À minha Daisy, Dinha, Jokinha. A minha alma gémea canina, os melhores abraços serão sempre os teus ainda que tu não estejas tão convencida sobre isso. Obrigada pela companhia nas noites longas de ansiedade, sei que me compreendes.

Resumo

A leishmaniose canina (LCan) é uma zoonose mundial de prevalência crescente. Até ao momento ainda não foi descoberta uma cura para esta patologia e os estudos sobre a sua prevenção e tratamento estão em constante atualização. O desenvolvimento de resistências aos tratamentos atuais e o aumento da prevalência da doença, trazem a necessidade de pesquisa sobre novas abordagens terapêuticas. Por ser uma doença crónica, a leishmaniose cria situações de stresse oxidativo no organismo. O presente estudo, analisou os níveis de stresse oxidativo e o efeito de uma suplementação oral com cápsulas de ozono durante 30 dias, em animais padecentes desta patologia. Para tal, foram feitas análises de hemograma, bioquímicas e avaliação de stresse oxidativo. A análise estatística do estudo, com recurso aos testes t e ANOVA unidirecional, permitiu observar nos animais padecentes de LCan, melhorias nos parâmetros neutrófilos ($p=0,0491$), globulinas ($p=0,0329$) e albumina ($p=0,0076$). Estes resultados reforçam o potencial da ozonoterapia na modulação da resposta imune. Ainda, as informações recolhidas permitem concluir sobre os níveis de stresse oxidativo nestes animais e contribuir com informação para base de dados sobre a avaliação desse parâmetro em Medicina Veterinária.

Palavras Chaves: *Leishmania infantum*; medicina integrativa; óleo ozonizado; desíquilíbrio redox

Abstract

Canine leishmaniasis (CanL) is a worldwide zoonosis of increasing prevalence. To date, no cure has been found for this disease and studies into its prevention and treatment are constantly being updated. The development of resistance to current treatments and the increase in the prevalence of the disease have led to the need for research into new therapeutic approaches. As a chronic disease, leishmaniasis creates situations of oxidative stress in the body. This study analyzed the levels of oxidative stress and the effect of oral supplementation with ozone capsules for 30 days in animals suffering from this disease. To this end, blood count, biochemical and oxidative stress analysis were carried out. The statistical analysis of the study, using the t-test and one-way ANOVA, showed improvements in neutrophils ($p=0.0491$), globulins ($p=0.0329$) and albumin ($p=0.0076$) in animals suffering from CanL. This results reaffirm the potential of ozone therapy in modulating of the immune response. In addition, the information gathered, allows us to conclude on the levels of oxidative stress in these animals and to contribute with information to the database on the evaluation of this parameter in Veterinary Medicine.

Key words: *Leishmania infantum*; integrative medicine; ozonated oil; redox imbalance

Lista de símbolos e abreviaturas

% - Percentagem

® - Marca Registrada

AHMA- auto-hemoterapia maior

AHME- auto-hemoterapia menor

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

Bregs- células B reguladoras

CAMV - Centro de Atendimento Médico Veterinário

CAT - catálase

CLCan - leishmaniose cutânea

COX-2 - ciclo-oxigenase-2

CXCL2 - quimiocina 2

DGAV- Direção-Geral da Alimentação e Veterinária

DDO- Doenças de Declaração Obrigatória

DNA - ácido desoxirribonucleico

EEG - exame de estado geral

FA - fosfatase alcalina

GPx - Glutathione Peroxidase

GST - Glutathione S-Transferase

H₂O₂ - peróxido de hidrogénio

HO-1 - Heme Oxigenase-1

HSP - Proteínas de Choque Térmico (do inglês, *heat shock proteins*)

IECAs- inibidores da enzima conversora de angiotensina

IFN-γ - interferon gama

IgD - imunoglobulina D

IL-10 - interleucina 10

IL-17- interleucina 17

IL-2 - interleucina 2

IL-3- interleucina 3

IM - intramuscular

iNOS - óxido nítrico sintase

IP- índice de peróxidos

IR - insuficiência renal

Kg- Kilogramas

LCan - leishmaniose canina

LOPs - produtos da lipoperoxidação (do inglês, *lipid oxidation products*)

NF-κB - Fator Nuclear kappa B

NO - óxido nítrico

Nrf2 - Fator Nuclear Eritroide 2

O₂ - oxigénio

O₃ - ozono

OMS - Organização Mundial de Saude

PCR - reação em cadeia da polimerase

PDGF- Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (do inglês *platelet-derived growth factor*)

PO - *per os*

PUFA's- ácidos gordos polinsaturados

RNA - ácido ribonucleico

RNS - espécies reativas de nitrogénio

ROS - espécies reativas de oxigénio (do inglês *reactive oxygen species*)

SC - subcutânea

SIAC - Sistema de Informação de Animais de Companhia

SNS- Sistema Nacional de Saúde

SOD - enzima superóxido dismutase

TH1 - células T *helper* 1

TLR - recetores do tipo *Toll*

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

VEGF- Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (do inglês, *vascular endothelial growth fator*)

VLCan - leishmaniose visceral (VCanL)

Índice Geral

Índice de gráficos.....	10
Índice de tabelas.....	11
Índice de figuras	12
Casuística de Estágio Curricular	13
1. Introdução	17
1.1. Leishmaniose Canina.....	17
1.1.1 Epidemiologia	19
1.1.2 Patofisiologia.....	21
1.1.3 Apresentação Clínica	24
1.1.4 Alterações Laboratoriais.....	25
1.1.5 Diagnóstico	26
1.1.6 Tratamento.....	27
1.2. Ozonoterapia	30
1.2.1 Aplicações terapêuticas	30
1.2.1.1 Ação anti inflamatória	31
1.2.1.2 Modulação de imunidade.....	32
1.2.1.3 Capacidade anti oxidante	32
1.2.1.4 Modulação hematológica e vascular.....	32
1.2.1.5 Combate a doenças infecciosas.....	33
1.2.1.6 Cicatrização.....	34
1.2.2 Ozonoterapia na Leishmaniose Canina.....	34
2. Material e Métodos.....	37
2.1 Animais	37
2.2 Hemograma e Bioquímicas	37
2.3 Análise de stresse oxidativo	38
2.4 Protocolo de Ozonoterapia.....	38
2.5 Análise estatística	39
3. Resultados	40
4. Discussão	44
5. Conclusão	48
6. Referências Bibliográficas	49
Apêndice A.....	I
Apêndice B.....	II
Apêndice C	III
Anexo A	IV
Anexo B	V

Índice de gráficos

Gráfico 1- Distribuição dos casos observados por espécie animal.....	14
Gráfico 2- Distribuição dos casos observados pelas várias áreas de medicina.....	14
Gráfico 3 - Exames imagiológicos realizados durante o estágio curricular.	15
Gráfico 4 - Animais vistos pertencentes a associação <i>versus</i> não pertencentes a associação.	15
Gráfico 5- Valor de média de neutrófilos antes e após realização do protocolo.	41
Gráfico 6- Valor de média de globulinas e albumina antes e após realização do protocolo.	42
Gráfico 7- Resumo dos valores de média e desvio padrão de d-ROMs, PAT e OSI redox...	43

Índice de tabelas

Tabela 1- Resultados dos testes estatísticos em relação ao hemograma, na avaliação do protocolo entre os grupos 1 e 2.	40
Tabela 2- Resultados dos testes estatísticos em relação às análises bioquímicas, na avaliação do protocolo entre os grupos 1 e 2.....	41
Tabela 3- Resultados dos testes estatísticos em relação ao <i>stress</i> oxidativo, na avaliação do protocolo entre os grupos 1 e 2.	42
Tabela A1- Tabela resumo dos valores de hemograma do grupo 1.	I
Tabela A2- Tabela resumo dos valores de hemograma do grupo 2.	I
Tabela A3- Tabela resumo dos valores de hemograma do grupo 3.	I
Tabela A4- Tabela resumo dos valores de bioquímicas do grupo 1.	I
Tabela A5- Tabela resumo dos valores de bioquímicas do grupo 2.	I
Tabela A6- Tabela resumo dos valores de bioquímicas do grupo 3.	I
Tabela B1- Tabela de resultados do teste Anova unidirecional para o exame de hemograma, entre os três grupos de estudo. Considerado o valor de p com significância $p < 0,05$	II
Tabela B2 - Tabela de resultados do teste Anova unidirecional para o exame de bioquímicas, entre os três grupos de estudo. Considerado o valor de p com significância $p < 0,05$	II
Tabela B3- Tabela de resultados do teste Anova unidirecional para o exame de <i>stress</i> oxidativo, entre os três grupos de estudo. Considerado o valor de p com significância $p < 0,05$	II
Tabela C1- Tabela de resultados dos testes de <i>stress</i> oxidativo dos animais do Grupo 1. .	III
Tabela C2- Tabela de resultados dos testes de <i>stress</i> oxidativo dos animais do Grupo 2. .	III
Tabela C3- Tabela de resultados dos testes de <i>stress</i> oxidativo dos animais do Grupo 3. .	III
Tabela A1 – Tabela de estadiamento de Leishmaniose Canina (Solano-Gallego et al., 2011).	IV

Índice de figuras

Figura 1 - Ciclo de vida do protozoário <i>Leishmania</i> no cão (Adaptado de Solano-Gallego et al., 2011).....	18
Figura 2 - Mapa da distribuição de <i>L.infantum</i> pela Europa (Adaptado de Solano-Gallego et al., 2011).....	19
Figura 3 – Seroprevalência de LCan nos vários distritos de Portugal (Adaptado de Almeida et al., 2022).....	20
Figura B1 - Protocolo de medição de d-ROMs e teste PAT fornecido por H&L srl.	V

Casística de Estágio Curricular

O estágio curricular no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizou-se na clínica veterinária Bатуca Vet, sob orientação da Dra. Susana Bатуca. Teve uma duração total de 792 horas, num período de 5 meses, onde foi possível passar por distintas áreas da clínica de animais de companhia.

Em termos de horários, estes variaram entre horário da manhã (9 horas até às 17 horas), intermédio (11 horas até às 19 horas) ou tarde (14 horas até às 21 horas e 30 minutos), durante os dias úteis. Foi também realizado estágio aos fins de semana que incluía um a dois sábados, e um domingo por mês.

Os horários da manhã e noite incluíram o tratamento dos animais internados, na primeira e última hora do dia, respetivamente, onde eram feitos exames de estado geral (EEG), administração de medicações, aplicações, manutenções e remoções de cateter, mudança de pensos, manutenção de algalias, alimentação por sondas alimentares e higienização. Durante o dia também foram realizados nestes animais administração de medicações, curvas de glicémia e testes endócrinos. A autora também realizou outras tarefas em diferentes rotações por várias áreas, dando apoio de variadas formas, nomeadamente:

- Nas consultas nas diversas áreas de medicina de animais de companhia, auxílio na contenção dos animais, na realização de exames complementares (por exemplo, colheita de sangue, exame dermatológico, oftalmológico e neurológico) e testes rápidos de diagnóstico;
- Em exames complementares de diagnóstico imagiológico, como ecografia abdominal, radiografia, ecocardiografia, fazendo a contenção dos animais;
- Em cirurgia, seja na área de anestesia, preparação do animal (incluindo colheita de sangue, aplicação de cateter, desenvolvimento protocolo anestésico, entubação e assepsia cirúrgica) seja enquanto ajudante de cirurgião ou apoio no recobro;
- Em triagens e consultas de urgência, através da realização de anamnese, EEG, aplicação de cateter, oxigenioterapia, apoio em toracocenteses, algaliação, colheita de sangue, suturas e aplicações de medicação;
- Em laboratório realizando urianálise tipo I e II, coloração de lâminas de citologia, hemograma e bioquímicas séricas e visualização de citologias ao microscópio;
- Em consultas realizadas ao domicílio.

Foram vistos no total 331 casos, dos quais 50% eram cães e 50% eram gatos (Gráfico 1).

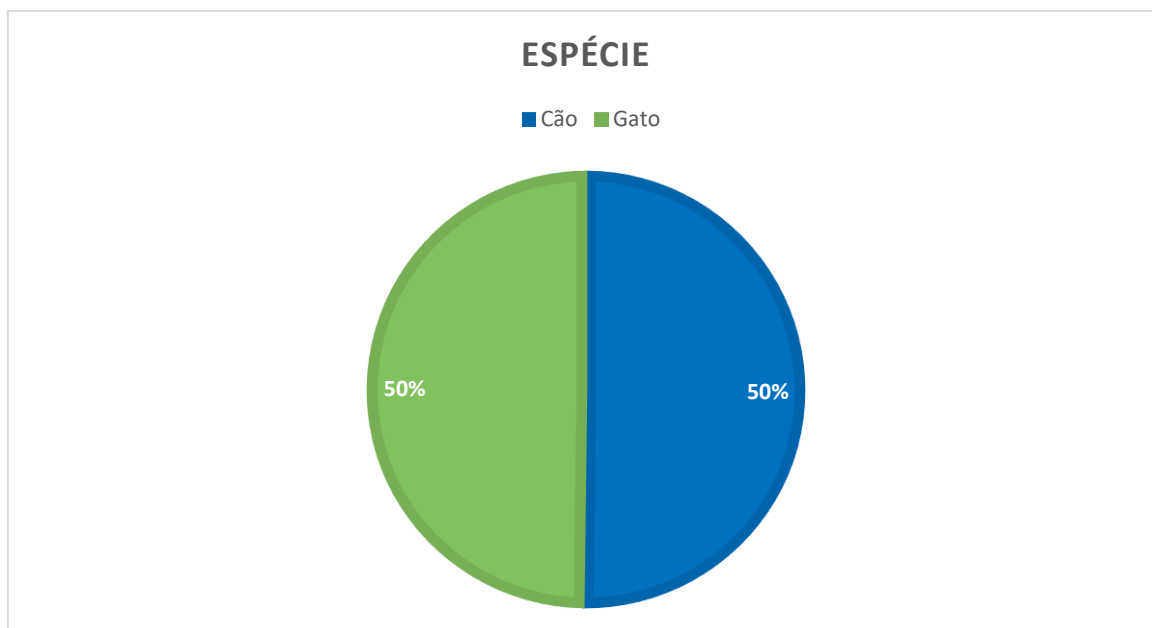


Gráfico 1- Distribuição dos casos observados por espécie animal.

O Gráfico 2 ilustra a distribuição pelas várias áreas abordadas durante o estágio, sendo possível observar que a maior incidência de casos foi no âmbito de urgências, correspondendo a 29% dos casos, seguido da medicina preventiva, com 23% dos casos. Além destes, foram acompanhados também casos nas áreas de imagiologia, cirurgia, medicina interna, dermatologia, oncologia, oftalmologia, estomatologia, cardiologia e neurologia. A imagiologia foi também muito utilizada nas urgências e cardiologia como apoio ao diagnóstico. No total foram realizadas 30 ecografias abdominais, 37 radiografias e 6 ecocardiogramas (Gráfico 3).

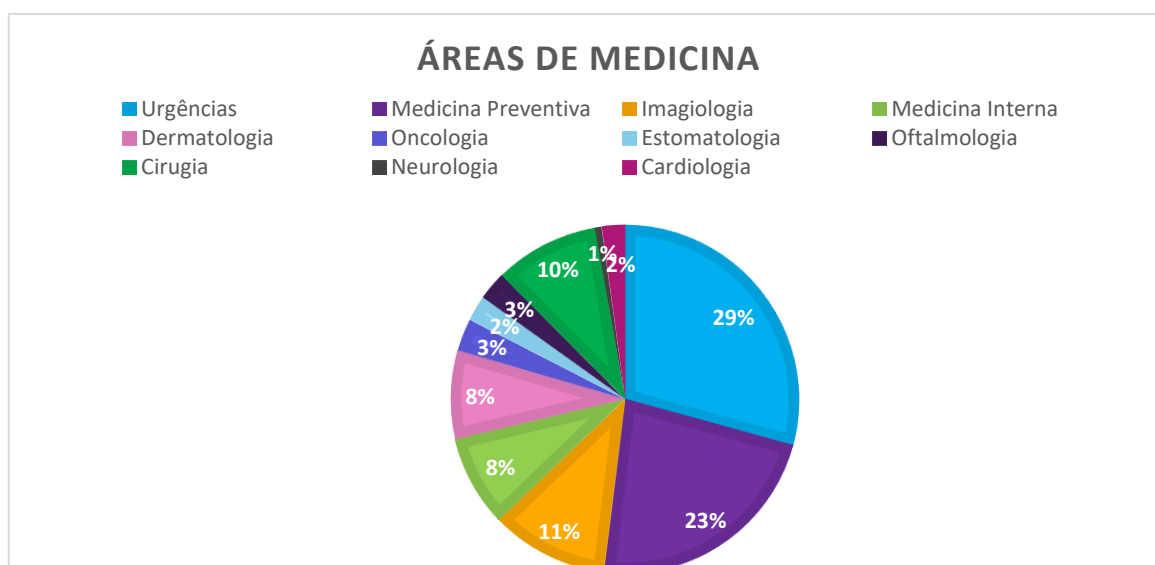


Gráfico 2- Distribuição dos casos observados pelas várias áreas de medicina.

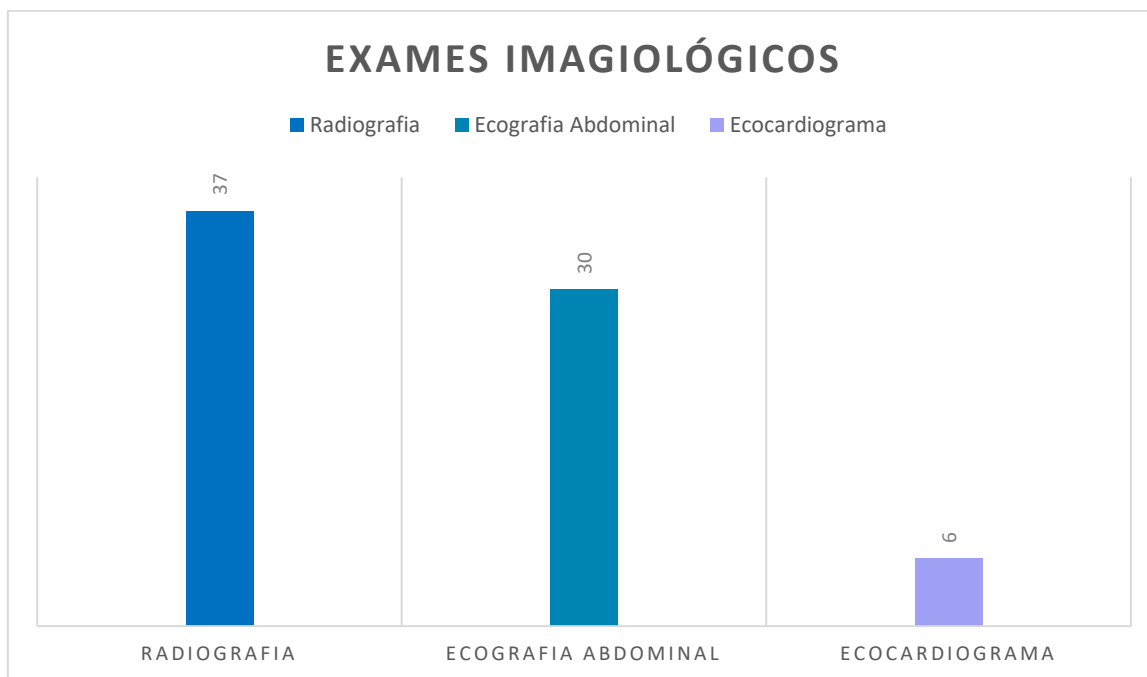


Gráfico 3 - Exames imagiológicos realizados durante o estágio curricular.

O local de estágio tinha um protocolo com uma associação animal sem fins lucrativos, o que permitiu uma perspetiva interessante à abordagem de animais de associação e ainda forneceu muita casuística, sendo que 11% dos casos eram animais de associação (Gráfico 4).



Gráfico 4 - Animais vistos pertencentes a associação *versus* não pertencentes a associação.

Durante todo o período de estágio existiu a possibilidade de participar em todos os procedimentos realizados e foi dada independência na realização de muitos dos exames complementares, nomeadamente colheitas de sangue, radiografias, citologias, observações em microscópio, urianálises, hemogramas e bioquímicas. Adicionalmente, sempre foi dada a possibilidade de participar na passagem de casos clínicos bem como discussão de casos e desenvolvimento de protocolos terapêuticos, oportunidade que permitiu melhor desenvolvimento de raciocínio clínico. Foi possível participar em formações de nutrição animal, realizadas por marcas de rações animais, e em reuniões com representantes de indústrias farmacêuticas. Estas oportunidades foram importantes para aumentar o conhecimento sobre fornecedores de serviços na área da medicina veterinária e também para compreensão do funcionamento deste tipo de eventos para futura participação, como profissional formada.

Foi também possível aprender a fazer trabalho relacionado a burocracia, fazendo o registo de animais no Sistema de Informação de Animais de Companhia (SIAC), preenchendo formulários de requisição de exames a laboratórios externos e termos de responsabilidade junto com os tutores.

Ao longo do estágio foram também adquiridas competências pessoais como: i) atendimento ao público, devido à independência dada para a recolha de anamneses em consultas e urgências; ii) competências no âmbito de relacionamentos profissionais, uma vez que sendo um Centro de Atendimento Médico-Veterinário (CAMV) que conta com um grande corpo clínico, foi necessário trabalhar com muitos profissionais diferentes; iii) competências de gestão de stresse no trabalho, com a gestão dos animais em internamento e urgências.

O estágio foi também importante para a realização do projeto de tese em questão. Por um lado, facilitou uma vez que alguns dos animais utilizados no estudo foram aqui angariados e, por outro lado, possibilitou a recolha do material utilizado para o estudo no local.

1. Introdução

A leishmaniose canina é uma doença zoonótica, considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das zoonoses mais relevantes mundialmente (Pires et al., 2019). Causada por protozoários do género *Leishmania*, esta doença multissistémica, comum nas zonas tropicais e subtropicais, está cada vez mais a expandir-se para o hemisfério norte, principalmente devido às alterações climáticas vividas (Almeida et al., 2022 & Morales-Yuste, Martín-Sánchez, & Corpas-Lopez, 2022). Este facto acontece, pois a sua principal via de transmissão, a fêmea flebótomo, tem como *habitat* preferencial climas mais quentes e húmidos, condições que se tornam mais presentes nestas regiões, com as alterações climáticas [European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2020].

A manifestação desta doença é muito variável podendo ir desde uma apresentação crónica sem sinais clínicos, a uma doença aguda de rápida progressão, e até mortal (Cacheiro-Llaguno et al., 2021; Maia & Campino, 2018; Solano-Gallego et al., 2011).

O tratamento da LCan é feito pelo uso de leishmanicidas e leishmanioestáticos, mas apresenta algumas limitações (Cavalera et al. 2021). O custo dos medicamentos, a complexidade do tratamento que leva à falta de *compliance* pelos tutores, efeitos tóxicos associados e o desenvolvimento de resistências aos fármacos, causados principalmente pelo uso de monoterapia (Bastos et al., 2022; Cabral et al., 2020; Kurami et al., 2023; Morales-Yuste et al., 2022; Passero et al., 2018). Além disto, a OMS recomenda a utilização de diferentes fármacos entre humanos e animais de forma a evitar o desenvolvimento de resistências, uma vez que alguns fármacos nos cães têm ação leishmanicida fraca, o que promove a sobrevivência do parasita e o desenvolvimento de resistências (OMS, 2023). Desta forma, é importante a pesquisa de novas abordagens à doença que permitam diminuir a dosagem dos medicamentos utilizados, diminuir o desenvolvimento de resistências e até mesmo descobrir novas substâncias com potencial uso (Kurami et al., 2023; Passero et al., 2018).

1.1. Leishmaniose Canina

Segundo a OMS, a leishmaniose é uma das zoonoses negligenciadas mais relevantes a nível mundial (Pires et al., 2019), estimando-se que ocorram anualmente entre 700000 a 1 milhão de novos casos em humanos (OMS, 2023).

Esta doença é causada por um protozoário intracelular do género *Leishmania* spp., que entra no organismo através da picada de uma fêmea de flebótomo, um inseto hematófago do género *Phlebotomus* spp., presente no Velho Mundo (zonas de Europa, Ásia e África), ou do género *Lutzomyia* spp., presente no Novo Mundo (zona das Américas) (ECDC, 2020).

Esta, ao alimentar-se, infeta o hospedeiro com a forma infetante de *Leishmania*-promastigotas metacíclicas [Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2017]. A reação do sistema imunitário leva a que estas formas sejam fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, local onde o protozoário evolui para a sua forma amastigota e inicia a sua multiplicação. A fêmea flebótomo, por sua vez, é infetada quando ocorre ingestão do sangue do hospedeiro com células infetadas com a forma amastigota. No seu trato digestivo, estas formas passam ao estado promastigota e migram depois para a probóscide, onde atingem a sua forma infetante- promastigota metacíclica (Fig.1) (CDC, 2017; Morales-Yuste et al., 2022).

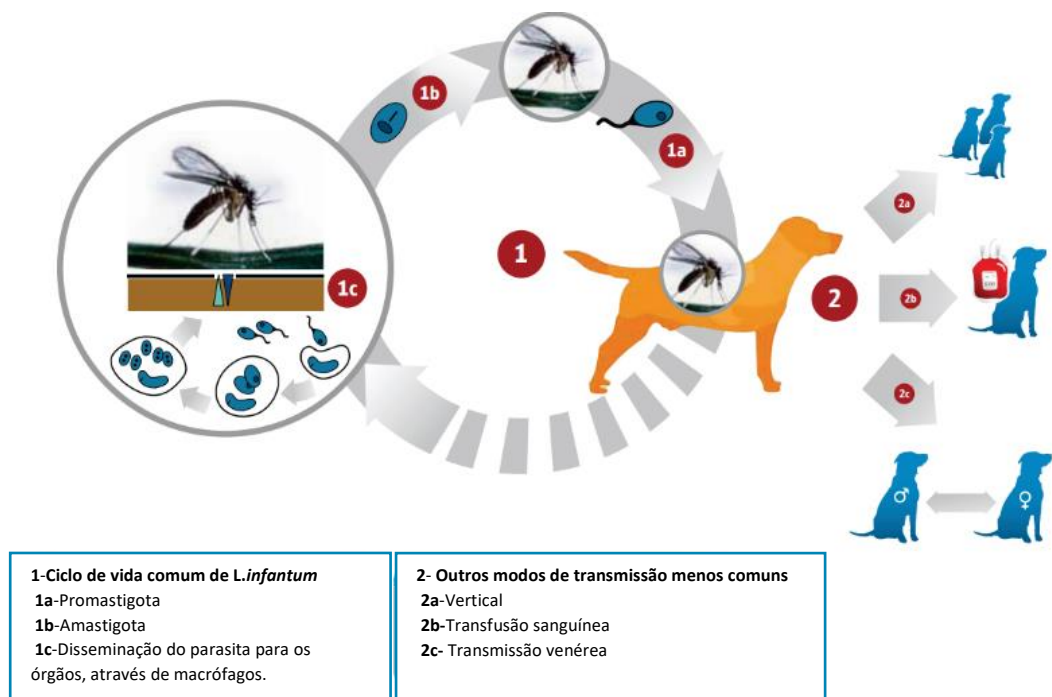


Figura 1 - Ciclo de vida do protozoário *Leishmania* no cão (Adaptado de Solano-Gallego et al., 2011).

A leishmaniose canina é causada principalmente pela espécie *Leishmania infantum*, no entanto existem múltiplos relatos de infeção por outras espécies [World Organisation for Animal Health (WOAH)], 2021. Os cães são o principal reservatório de *L. infantum* e, por isso, representam um papel importante na transmissão da doença. A 22 de abril de 2024, a Direção-Geral da Alimentação e Veterinária (DGAV), imitiu uma atualização da lista de Doenças de Declaração Obrigatória (DDO), onde a leishmaniose integrou. Estudos realizados já demonstraram que o aumento do número de casos de LCan precede o aumento de casos da doença em humanos (García-Castro et al., 2022).

Em Portugal, as espécies comprovadas de flebótomos vetores de *L.infantum* são *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus ariasi* (Pires et al., 2019; Serafim et al., 2019).

Além da propagação da doença através de vetores, está documentada a transmissão vertical, a transmissão por transfusões de sangue de animais portadores e a transmissão venérea (Fig.1) (Ivănescu et al., 2023; Solano-Gallego et al., 2011).

1.1.1 Epidemiologia

Os flebótomos têm preferência por *habitats* quentes e húmidos e por isso são mais comuns em zonas tropicais e subtropicais (ECDC, 2020). No entanto, com as subidas de temperatura generalizadas no mundo bem como os níveis de precipitação alterados, devido às alterações climáticas que têm vindo a ocorrer, estes vetores estão a começar a dispersar-se (ECDC, 2020). A leishmaniose está distribuída de forma endémica pela Ásia, América Latina, África e Bacia do Mediterrâneo, e está emergente na América do Norte (García-Castro et al., 2022; OMS, 2023).

Na Europa, também as transformações climáticas estão a contribuir para a alteração da distribuição da doença (Almeida et al., 2022; OMS, 2023; Solano-Gallego et al., 2011). Além disso, a importação e exportação de animais são fatores com influência nesta alteração de distribuição (Almeida et al., 2022; OMS, 2023; Solano-Gallego et al., 2011). Países como Espanha, Portugal, França, Itália e Grécia têm grande incidência de casos (Fig.2) (Almeida et al., 2022; Morales-Yuste et al., 2022) e prevê-se que, dentro dos próximos anos, a LCan se torne endémica no resto do continente sendo que, em zonas como Alemanha e Reino Unido, o número de casos reportados já tem aumentado (ECDC, 2020; Solano-Gallego et al., 2011).

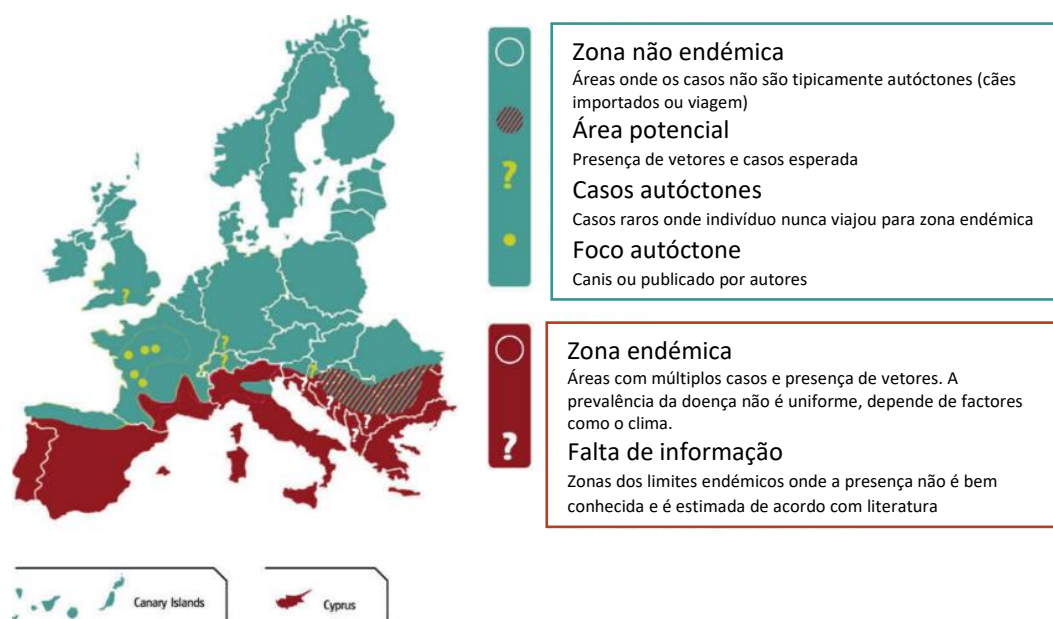


Figura 2 - Mapa da distribuição de *L.infantum* pela Europa (Adaptado de Solano-Gallego et al., 2011).

Em Portugal a LCan é uma doença endémica de grande incidência e com muita importância veterinária (Almeida et al., 2022). Existem 3 principais zonas descritas como endémicas de LCan: Região do Alto Douro, Região do Algarve e Região da Área Metropolitana de Lisboa (Amaro et al. 2023).

Um estudo realizado a nível nacional em 2012, demonstrou uma prevalência de 6,31% de leishmaniose canina em Portugal. Mais recentemente, dez anos após este estudo, em 2022, foi feito um novo estudo, que contou com a colaboração de noventa e oito clínicas veterinárias distribuídas por todo o país e obteve o resultado de 12,5% de seroprevalência, excluindo animais com anticorpos vacinais (Almeida et al., 2022). Entre os vários distritos, aqueles com maior prevalência foram Portalegre e Castelo Branco (Fig.3) (Almeida et al., 2022).

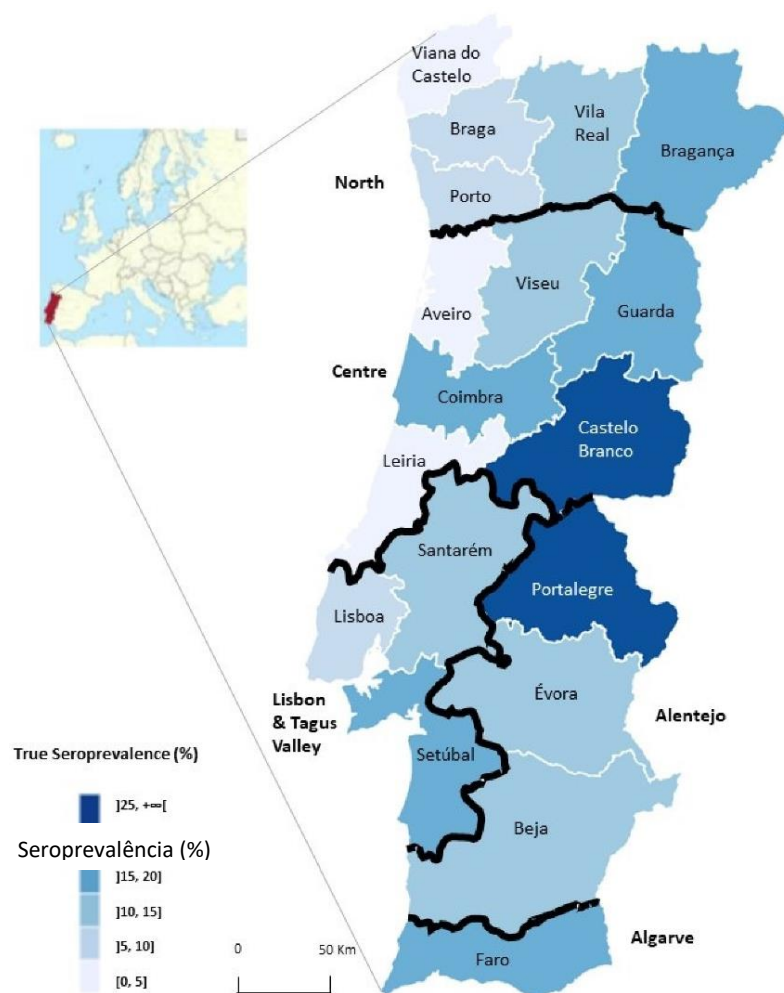


Figura 3 – Seroprevalência de LCan nos vários distritos de Portugal (Adaptado de Almeida et al., 2022).

1.1.2 Patofisiologia

A resposta imunológica na LCan é muito importante para a compreensão da patogenia da doença (Gonçalves et al., 2019).

Quando um cão é infectado com *L. infantum* pelo vetor podem ocorrer respostas variadas. O sistema imunitário pode conseguir de imediato eliminar o parasita ficando o animal livre da doença ou pode não o conseguir fazer (García-Castro et al., 2022). Deste último cenário resultam dois tipos de resposta, que podem desenvolver padrões de resistência ou suscetibilidade à infecção. Estes padrões irão definir a forma clínica da doença apresentada (Gonçalves et al., 2019). Quando o indivíduo apresenta o sistema imunitário saudável e equilibrado, ele torna-se um portador assintomático da doença e não desenvolve sinais clínicos associados. Por outro lado, se o sistema imunitário se encontrar debilitado e desequilibrado, e por isso a sua resposta se demonstrar ineficaz, a doença vai apresentar manifestações clínicas e o indivíduo é considerado um portador sintomático (García-Castro et al., 2022).

A infecção por *L. infantum* pode causar duas formas de leishmaniose: a leishmaniose cutânea (CLCan) e visceral (VLCan). A infecção inicialmente manifesta-se apenas por sinais cutâneos (leishmaniose cutânea) e pode resolver-se sem tratamento através da resposta imune do hospedeiro. Havendo uma dispersão do parasita a nível das mucosas, teremos um quadro muco-cutâneo e, quando esta dispersão atinge órgãos como rim, baço ou medula óssea, classifica-se a doença como leishmaniose visceral. Esta forma é a que apresenta pior prognóstico (Ivănescu et al., 2023; Ready, 2010).

Ao entrar no organismo, o protozoário *L. infantum* induz um processo de recrutamento celular nomeadamente de neutrófilos, as primeiras células que entram em contacto com as formas promastigotas (Gonçalves et al., 2019; Ivănescu et al., 2023; Toepp & Petersen, 2020). Nesta fase, os neutrófilos levam à destruição dos parasitas através de um processo de explosão oxidativa e levam também à produção de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferão gama (IFN- γ), que por sua vez fazem recrutamento de macrófagos para auxílio na resposta imune (Ivănescu et al., 2023; Toepp & Petersen, 2020). Neste processo cria-se um ambiente pró-inflamatório (Gonçalves et al., 2019).

Este mecanismo de defesa do organismo pode falhar ou ser mais tardio, uma vez que este parasita desenvolveu um mecanismo de sobrevivência. Ao ser fagocitado, o protozoário infiltra-se num vacúolo parasitóforo dentro da célula. Este processo evita uma resposta à infecção, evitando a sua destruição, que por sua vez permite a sua persistência. Alojadas nestas células, as formas promastigotas chegam aos linfonodos próximos onde irão

depois ser transportadas para outras partes do corpo (Ivănescu et al., 2023; Toepp & Petersen, 2020).

O principal mecanismo envolvido na imunidade protetora de cães com *L. infantum* é a produção de óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintase (iNOS) e espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) por parte dos macrófagos, estas moléculas afetam o parasita a nível mitocondrial, levando a uma lesão metabólica fatal para o mesmo (Cabral et al., 2021). Esta produção é estimulada pelas citocinas IFN- γ , TNF- α e interleucina 2 (IL-2), que ativam os macrófagos e permitem assim, o controlo do parasita (Ivănescu et al., 2023; Maia & Campino, 2018). Além disto, na superfície dos macrófagos, existem recetores do tipo Toll (TLR, *toll-like receptors*), especificamente TLR-4, que induzem a produção de radicais de oxigênio.

De forma a combater a ação dos macrófagos, as formas amastigotas de *Leishmania* desenvolveram métodos como a produção de antioxidantes, entre eles a enzima superóxido dismutase (SOD) (Alishvandi et al., 2024; Toepp & Petersen, 2020). Esta enzima afeta a ação do NO, iNOS e ROS e promove o crescimento do parasita dentro da célula (Alishvandi et al., 2024; Toepp & Petersen, 2020).

A resposta por parte dos linfócitos tipo T é essencial no controlo da Leishmaniose. A resistência à LCan está relacionada a maiores número de células T circulantes nomeadamente CD4⁺ e CD8⁺ (García-Castro et al., 2022). Para combater o parasita, os macrófagos produzem interleucina 12 (IL-12) que promove uma resposta com células T *helper* 1 (TH1), caracterizada pela proliferação de linfócitos T CD4⁺ e produção de IFN- γ , que ativa mais macrófagos. Estas células, T CD4⁺ TH1, também produzem interleucina 3 (IL-3), quimiocina 2 (CXCL2, *C-X-C motif chemokine ligand 2*) e TNF- α , que desempenham um papel importante no recrutamento, manutenção e diferenciação dos macrófagos, bem como IL-2, que levam à formação de mais células T, favorecendo ainda mais a destruição da *Leishmania* (Ivănescu et al., 2023; Toepp & Petersen, 2020).

As células Th17 também têm um papel na infeção por LCan através da libertação de interleucina 17 (IL-17) que recruta neutrófilos e macrófagos ao local de infeção. Um recrutamento contínuo por parte da IL-17 leva a um aumento excessivo de células, que consequentemente, podem causar danos teciduais, consequência observadas na CLCan (Toepp & Petersen, 2020). As células T CD8⁺ também têm um papel importante de defesa, devido à sua atividade citolítica contra macrófagos infetados por *L. infantum* (Toepp & Petersen, 2020).

A regulação da resposta imunitária é influenciada pelas células B. Estas células interagem com as células T e há produção de anticorpos contra *L. infatum* e requisição de células T CD4+. As células B reguladoras (Bregs) produzem interleucina 10 (IL-10) que diminuem os efeitos indesejáveis de outras interleucinas (Toepp & Petersen, 2020).

Na LCan o grande desafio é o equilíbrio da resposta imunológica, mas com a evolução da doença, os mecanismos de defesa mencionados começam a falhar. Durante a doença subclínica as células T CD8+ fazem produção de IL10 com o objetivo de diminuir os danos causados por outras citocinas inflamatórias (Toepp & Petersen, 2020). Com o desenvolvimento da doença e a exposição prolongada ao antígeno à IL-10, a ação das células T CD4+ diminui e por sua vez, diminui também a produção de IFN- γ e os macrófagos deixam de ser recrutados ao combate da infecção (García-Castro et al., 2022; Toepp & Petersen, 2020). Durante este período, a circulação de IgG aumenta, resultando na produção de imunocomplexos que não só desencadeiam a produção de IL-10, como também se depositam em órgãos vitais como rim e baço e levam à sua falência, sinais observados na VLCan (Parody et al., 2019; Toepp & Petersen, 2020). A circulação de imunoglobulina D (IgD) vai igualmente estimular as células Bregs à produção de IL-10, que mais uma vez diminui o recrutamento das principais células que combatem o parasita, os macrófagos (García-Castro et al., 2022; Toepp & Petersen, 2020). A circulação destes imunocomplexos é exacerbada pela morte dos macrófagos que sofrendo lise, libertam formas amastigotas do parasita para circulação, que levam ao aumento da resposta humoral (Parody et al., 2019). Todos estes processos o organismo entra numa fase de exaustão celular (Toepp & Petersen, 2020).

Durante doenças crônicas como a leishmaniose, a produção ROS aumenta e o consumo de antioxidantes por parte do organismo aumenta na tentativa de neutralizar estas moléculas (Gonçalves et al., 2021; Maia & Campino, 2018). Um aumento excessivo de ROS com uma escassez de antioxidantes leva ao desequilíbrio *redox* no organismo, criando um ambiente de stresse oxidativo (Gonçalves et al., 2021; Maia & Campino, 2018). Situações de stresse oxidativo perpetuam situações de inflamação. A circulação de IL-10 também inibe a expressão da iNOS, reduzindo a atividade dos macrófagos, contribuindo mais uma vez para a persistência do parasita no sangue (García-Castro et al., 2022).

A suscetibilidade e resposta à Leishmaniose está relacionada a alguns fatores intrínsecos ao animal (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Maia & Campino, 2018). Em termos genéticos, existem alguns genes associados a uma menor suscetibilidade ou a uma melhor resposta à invasão pelo parasita (Baneth & Solano-Gallego, 2022). Algumas raças de cães têm maior representação da doença como o Rottweiler, Doberman Pinscher e Pastor Alemão. Os cães da raça Podengo de Ibiza têm uma resposta à doença predominantemente celular

(Baneth & Solano-Gallego, 2022). Animais com outras doenças transmitidas por vetores, como Eriquiose e Babesiose, têm uma evolução da doença mais grave (Baneth & Solano-Gallego, 2022). Em relação à idade dos animais, cães mais velhos têm uma apresentação clínica mais grave com mais sintomatologia sistêmica do que animais mais novos, que por sua vez têm mais sinais dermatológicos (Baneth & Solano-Gallego, 2022).

1.1.3 Apresentação Clínica

Os sinais clínicos inespecíficos mais comuns na LCan são perda de peso, anorexia, prostração, linfadenomegalia generalizada, poliúria e polidipsia e por vezes sinais gastrointestinais (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Green, 2012; Morales-Yuste et al., 2022). No entanto, outros sinais clínicos mais próprios da doença são comuns de encontrar, principalmente a nível dermatológico, ocular e renal (Green, 2012).

Como já mencionado, a pele é um dos órgãos afetado nesta doença. Lesões cutâneas (nodulares, pustulares e ulcerativas), onicogifose e dermatite esfoliativa, são sinais muito comuns (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Green, 2012; Morales-Yuste et al., 2022; Solano-Gallego et al., 2011). Outros sinais também observados incluem alopecia e mucosas pálidas (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Green, 2012; Solano-Gallego et al., 2011).

O baço é um órgão muito afetado durante a doença, porque recebe uma grande carga parasitária podendo levar a esplenomegalia, um dos principais sinais observados nestes animais (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Green, 2012; Morales-Yuste et al., 2022). Da mesma forma, mas não tanto como o baço, o fígado é afetado na LCan. É possível observar hepatomegalia e formação de granulomas neste órgão (Morales-Yuste et al., 2022).

É estimado de que 60 a 80% dos animais com LCan têm sinais oculares. Uveíte, queratoconjuntivite, conjuntivite e blefarite são os sinais mais documentados (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Green, 2012; Solano-Gallego et al., 2011).

Outro órgão, também gravemente afetado no decurso da doença, é a medula óssea, que leva, entre várias coisas, a distúrbios de coagulação. A epistáxis entra na lista dos sinais mais observados nos animais afetados por esta patologia (Green, 2012; Morales-Yuste et al., 2022; Solano-Gallego et al., 2011). Também hematúria e melena podem ser observados (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Morales-Yuste et al., 2022; Solano-Gallego et al., 2011).

O rim, à semelhança do baço e medula óssea, é um dos principais órgãos afetados, sendo a insuficiência renal (IR) a principal causa de morte nos animais afetados pela LCan (Cavalera et al. 2021; Morales-Yuste et al., 2022; Toepp & Petersen, 2020). Esta condição

ocorre devido à evolução da glomerulonefrite que é muitas vezes observada nestes pacientes (Green, 2012; Morales-Yuste et al., 2022). Isto ocorre porque o rim é um dos locais de deposição dos imunocomplexos que se criam na resposta imunitária (Cavalera et al. 2021). A IR é responsável por alguns dos sinais mais observados nos animais, como a poliúria, polidipsia e vômitos (Green, 2012; Morales-Yuste et al., 2022). A presença de insuficiência renal está associada a um agravamento do quadro severo (Green, 2012).

Outros sinais observados na LCan incluem dificuldade na locomoção, pancreatite, colite, rinite, miosite dos músculos mastigatórios e alterações neurológicas como paraparésia (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Green, 2012; Solano-Gallego et al., 2011).

1.1.4 Alterações Laboratoriais

O hemograma dos cães com LCan pode apresentar várias alterações uma vez que a medula óssea está muitas vezes afetada pela presença das formas amastigotas do protozoário, situação que pode alterar a hematopoiese (Morales-Yuste et al., 2022) e causa, muitas vezes, pancitopenia. A alteração mais comum é anemia não regenerativa, presente em 67% dos pacientes, seguido de linfopenia com 27% de prevalência, e esta última está associada a um pior prognóstico (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Maia & Campino, 2018). A trombocitopenia é menos comum, cerca de 6% dos animais apresentam esta alteração, que leva aos problemas de coagulação por vezes observados (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Green, 2012; Morales-Yuste et al., 2022). Outras possíveis causas para a anemia observada são o stresse oxidativo sobre o qual o organismo está exposto, pois pode levar à lise dos eritrócitos ou à diminuição do tempo de vida dos eritrócitos devido a aumentos de ureia que ocorrem em pacientes mais debilitados (Pugliese et al., 2021).

Em relação às alterações nos parâmetros bioquímicos, pelo facto de esta doença atingir vários órgãos, existem várias alterações. As alterações mais comuns são hiperproteinemia com aumento das gama-globulinas e das beta-globulinas que ocorre em cerca de 73% e 68%, respetivamente (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Maia & Campino, 2018). A hipoalbuminemia também é comum com cerca de 55% de prevalência. Hipoalbuminemia com hiperproteinemia está associado a um prognóstico negativo (Maia & Campino, 2018). Estas alterações levam à diminuição do rácio albumina/globulina (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Maia & Campino, 2018). Com a progressão da doença outros valores começam a alterar-se e o controlo destes é importante para monitorização da doença (Maia & Campino, 2018). Aumentos de ureia e creatinina são alterações comuns em pacientes em estádios mais avançados da doença, devido à IR instalada. Como o fígado é um dos órgãos

com maior carga parasitária, também o aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) começam a aumentar (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Gonçalves et al., 2019; Pugliese et al., 2021).

Outras alterações observadas nestes pacientes incluem proteinúria, associada ao dano renal, que acomete cerca de 48% dos animais, e alterações no estado oxidativo (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Maia & Campino, 2018; Pugliese et al., 2021). Estudos realizados por Pugliese et al. (2021), demonstraram um desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes em animais com LCan, situação que demonstra presença de stresse oxidativo nestes animais.

1.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da LCan nem sempre é fácil de realizar devido às variações na apresentação clínica, este pode ser feito através de inúmeras técnicas laboratoriais que apresentam as suas vantagens e desvantagens (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Ivănescu et al., 2023; Solano-Gallego et al., 2017).

A técnica mais utilizada é a serologia quantitativa, através da realização de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), técnica que permite a deteção de anticorpos contra *L.infantum* (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Ivănescu et al., 2023; Solano-Gallego et al., 2017). Os testes ELISA permitem avaliar o estado do paciente porque animais com maiores valores de anticorpos apresentam mais sinais clínicos associados à doença (Baneth & Solano-Gallego, 2022). Por outro lado, apresenta algumas desvantagens, como a impossibilidade de distinção de anticorpos vacinais, que pode afetar a interpretação do teste. Em Portugal, algumas das vacinas utilizadas para a prevenção da LCan produzem anticorpos que não permitem distinção entre vacinais ou não, aquando a realização de testes ELISA (nomeadamente a vacina CaniLeish®) (Solano-Gallego et al., 2017). No entanto, a utilização destas tem vindo a diminuir e a utilização da LetiFend®, uma vacina que permite a distinção dos anticorpos, tem aumentando. Isto permite uma avaliação do estado do animal mais clara, uma vez que todos os anticorpos quantificados estão de facto associados à evolução da doença (Solano-Gallego et al., 2017). Outra desvantagem dos testes ELISA, é que animais assintomáticos podem ter resposta negativa ou inconclusiva a estes testes uma vez que não há grande produção de anticorpos. Os testes rápidos serológicos qualitativos, como o Speed Leish K®, também são muito utilizados na clínica. São realizados previamente à realização da vacinação, uma vez que animais positivos à doença não devem ser vacinados (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Solano-Gallego et al., 2017).

Técnicas moleculares com a reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem a detecção do DNA do parasita, o que significa que um resultado positivo indica com certeza a infecção do animal (Baneth & Solano-Gallego, 2022). A infecção pode não ter sinais clínicos, o que torna este um bom teste para diagnóstico de animais assintomáticos. Esta técnica é mais eficaz quando realizada em amostras de medula óssea, linfonodos, baço e pele, o que não acontece comumente na clínica. Amostras de mais fácil acesso como sangue e urina, não são tão sensíveis (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Paltrinieri et al., 2016; Solano-Gallego et al., 2017).

O exame de referência para detecção de *L. infantum* é o exame parasitológico, que inclui observação direta no microscópio, seja a partir de esfregaços obtidos dos linfonodos, baço, fígado ou de medula óssea ou de biópsias de pele (Ivănescu et al., 2023). Contudo esta técnica não é muito utilizada pois a recolha de material é mais complexa e os resultados obtidos dependem da experiência do operador (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Ivănescu et al., 2023).

De forma geral, o recomendado pela LeishVet, uma associação científica que tem como foco de estudo a leishmaniose e procura a criação de *guidelines* de abordagem à patologia, é a realização de testes ELISA quantitativos e, quando estes resultados dão inconclusivos ou negativos mas a nossa suspeita continua forte, realizar métodos adicionais como PCR e avaliação citológica ou histológica (Baneth & Solano-Gallego, 2022).

1.1.6 Tratamento

Ao contrário dos humanos, nos cães a leishmaniose não tem um tratamento curativo pois a eliminação completa de *L. infantum* dos tecidos muito raramente é alcançada (Cavalera et al. 2021). Em vez disso, o tratamento procura melhorar a resposta imunológica do animal e reduzir a carga parasitária, para estabilizar a doença a um nível assintomático, evitar propagação e atrasar a sua evolução, o que não ocorre eventualmente, principalmente devido à descontinuidade do tratamento, levando a um relapso do animal (Cavalera et al. 2021; Morales-Yuste et al., 2022; Noli & Saridomichelakis, 2014).

A abordagem terapêutica depende do estadio da doença. De acordo com o grupo LeishVet, a doença pode ser dividida em 4 estádios: i) Estádio 1, doença assintomática ou ligeira; ii) Estádio 2, doença moderada; iii) Estádio 3, doença grave; iv) Estádio 4, doença muito grave (Anexo A) (Baneth & Solano-Gallego, 2022). O tratamento base da LCan inclui o uso de leishmanicidas e leishmanioestáticos, sendo os mais utilizados o antimoniato de

meglumina e a miltefosina como leishmanicidas e ainda o alopurinol como leishmanioestático (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Cavalera et al. 2021).

O alopurinol é um análogo da hipoxantina que bloqueia a síntese de RNA da leishmania interrompendo o seu crescimento (Santos et al., 2019). É um dos fármacos mais utilizados no manejo da doença devido ao seu potencial como leishmanioestático e a sua baixa toxicidade, que se demonstra útil no manejo dos animais que já sofrem de danos renais (Morales-Yuste et al., 2022). O seu principal efeito secundário associado é a urolitíase por cristais de xantina (Green, 2012; Torres et al., 2016). As resistências ao alopurinol ainda não estão bem documentadas mas já existem alguns estudos que confirmam a existência de resistência associada ao uso prolongado (Morales-Yuste et al., 2022; Yasur-Landau et al., 2017; Yasur-Landau et al., 2016).

O antimoniato de meglumina é um antimónio pentavalente que interrompe a glicólise e oxidação de ácidos gordos da leishmania, levando à sua morte (Baneth & Solano-Gallego, 2022). Por norma, é utilizado em conjunto com o alopurinol nas primeiras semanas de tratamento e administrado via sub-cutânea (Baneth & Solano-Gallego, 2022). As resistências ao antimoniato de meglumina devido ao seu uso não racional, já estão bem documentadas (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Morales-Yuste et al., 2022). Estirpes de *L. infatum* resistentes a este fármaco já foram documentadas em países como Espanha, Itália e França, e é expectável que mais surjam (Green, 2012; Morales-Yuste et al., 2022). Os efeitos secundários associados ao uso desta terapia são inflamação e dor no local de injeção e nefrotoxicidade (Baneth & Solano-Gallego, 2022).

A miltefosina é uma alquilfosfocolina utilizada no tratamento da LCan, substituindo o antimoniato de meglumina, é mais utilizado em situações e que já existe dano renal uma vez que consegue diminuir a proteinúria e tem menos efeitos secundários a nível renal (Morales-Yuste et al., 2022). O seu mecanismo de ação envolve o bloqueio de proteínas e recetores de membrana essenciais, que impedem não só que o parasita se aloje nos macrófagos, mas também que ocorra transdução de sinal da membrana (Gizzarelli et al., 2023). A resistência à miltefosina também já foi documentada tanto em humanos como animais (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Bockstal et al., 2020; Morales-Yuste et al., 2022). A sua forma de administração é via *per os* (PO) e os efeitos secundários possíveis da utilização deste fármaco são alterações gastrointestinais (Baneth & Solano-Gallego, 2022).

O uso de fármacos imunomoduladores também é uma grande ajuda no manejo da LCan, sendo a domperidona o mais utilizado. A domperidona induz o aumento de prolactina circulante, que ativa a IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ e leva ao recrutamento de macrófagos e células TCD4+, que ajudam na resposta ao parasita. Adicionalmente, esta também reduz o

número de imunocomplexos circulantes, o que ajuda à diminuição da deposição destes noutros locais do organismo (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Cavalera et al. 2021; Morales-Yuste et al., 2022).

O protocolo mais utilizado na Europa é o uso combinado do alopurinol, durante pelo menos 6 meses, e antimonio de meglumina ou em substituição deste último, miltefosina, durante 28 dias (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Santos et al., 2019). A monoterapia demonstra ter menos eficácia na redução da carga parasitária sendo, por isso, apenas utilizada em animais em estádios avançados, com insuficiência renal associada.

O tratamento é considerado um sucesso quando se reúnem três condições: desaparecimento dos sinais clínicos, a normalização dos exames hematológicos e uma serologia quantitativa com valores abaixo do nível limite de referência. Nesta altura o animal deve ser reavaliado e ponderada a interrupção ou alteração do tratamento (Baneth & Solano-Gallego, 2022).

Além disto, quando existe insuficiência renal, o maneio também é incluído no tratamento (Baneth & Solano-Gallego, 2022).

A monitorização dos animais recomendada, segundo o grupo LeishVet, varia de acordo com o quadro clínico (Baneth & Solano-Gallego, 2022). Deve fazer-se uma reavaliação 1 mês após início do tratamento e esta deve incluir exame físico completo e repetição do hemograma, bioquímicas e urianálise. Se após esta reavaliação o animal mostrar melhorias, então repetem-se os exames dentro de 3 a 4 meses no primeiro ano de tratamento. Após estabilização do quadro, devemos reavaliar de 6 em 6 a 12 em 12 meses (Baneth & Solano-Gallego, 2022). Os testes serológicos quantitativos também devem ser repetidos neste período de tempo, pois alterações no número de anticorpos podem prever recaídas no quadro e dar indicações sobre a necessidade de alterações ao tratamento (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Morales-Yuste et al., 2022).

É importante considerar que a resposta aos tratamentos mencionados varia de animal para animal e, por isso, estes devem sempre ser adaptados (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Cavalera et al. 2021).

Os cães infetados com LCan são uma fonte de infeção para os vetores da doença, representando um risco para a saúde pública. Por isso, é crucial começar ou manter as medidas profiláticas recomendadas, utilizando repelentes tópicos da classe dos piretróides (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Morales-Yuste et al., 2022). Na Europa, é mais comum o uso combinado desses repelentes na forma de coleiras e pipetas (Morales-Yuste et al., 2022).

1.2. Ozonoterapia

O ozono (O_3) é um gás constituído por 3 átomos de oxigénio, com um potencial oxidativo muito elevado (Sciorsci et al., 2020; Serra et al., 2023). Até ao século XVI este gás era apenas visto como um poluente tóxico, mas nesta altura o seu efeito terapêutico começou a ser falado (Liu et al., 2023). O uso médico deste gás é conhecido por ozonoterapia que consiste na administração de uma mistura de O_3 com oxigénio (O_2) criada num gerador médico (*International Scientific Committee of Ozone Therapy* [ISCO3], 2020). Através da produção de ROS, o O_3 consegue modular a resposta imunitária (Cenci et al., 2022). Esta terapia é bem documentada tanto em medicina humana como na veterinária (Sciorsci et al., 2020; Serra et al., 2023) e inclusive em alguns países, como Portugal, já é reconhecida pelo Sistema Nacional de Saúde (SNS), como um procedimento médico, segundo a Portaria n.º 163/2013, de 24 de abril.

1.2.1 Aplicações terapêuticas

O ozono é conhecido pelas suas várias propriedades médicas como anti-inflamatório, antioxidante, estimulante de imunidade, entre outras (Orlandin et al., 2021; Smith et al., 2017). A caracterização do O_3 como um suplemento pro-fármaco não é totalmente correta uma vez que, apesar de ser verdade que este age permitindo, através de mecanismos secundários, um aumento da ação dos fármacos, este gás também tem a capacidade de interagir diretamente com bactérias e vírus (Clavo et al., 2019; Smith et al., 2017).

A administração de O_3 pode ser feita através de duas vias, a via local ou a via sistémica, de acordo com o objetivo terapêutico (Sciorsci et al., 2020; Serra et al., 2023; Smith et al., 2017). As vias locais consistem na aplicação do gás em pontos específicos, que pode ser via subcutânea (SC), intravertebral, intramuscular (IM), intrarticular e paravertebral, ou através da aplicação direta em locais de lesão através do uso de soluções ozonizadas (água, soro fisiológico, óleos) ou da técnica de *bagging* (ISCO3, 2020; Oros et al., 2023; Sciorsci et al., 2020; Smith et al., 2017). Já na via sistémica, incluem-se a auto-hemoterapia maior (AHMA) e auto-hemoterapia menor (AHME), que consistem na ozonização de sangue recolhido do paciente e posterior aplicação neste mesmo paciente, via venosa ou em pontos específicos (via IM e SC, por exemplo) (ISCO3, 2020; Sciorsci et al., 2020). Outras formas de aplicação sistémica são PO, via rectal e vaginal. Existe também a via intra peritoneal mas esta ainda não está bem documentada (ISCO3, 2020).

A única via impraticável para a aplicação médica do O₃ é a inalação devido à sua toxicidade pulmonar (ISCO3, 2020; Nogales et al., 2008). Epífora, rinite, tosse, dor de cabeça e, por vezes, náuseas e vômitos são os efeitos secundários típicos da terapêutica com O₃. Os efeitos secundários mais graves podem causar lesões permanentes ou até morte (ISCO3, 2020; Sciorsci et al., 2020). A ozonoterapia está contra indicada em pacientes com hipertireoidismo e diabetes não controlados, gravidez, anemia grave, trombocitopenia grave, favismo, miastenia gravis, estados convulsivos e pacientes que estejam a realizar terapia com inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs) (ISCO3, 2020; Kozat & Okman, 2019; Sciorsci et al., 2020).

A dose do tratamento deve ser aplicada ao paciente consoante o seu peso e a sua condição clínica. De acordo com o ISCO3 (2020), podemos classificar as doses em: baixas, médias ou altas. Doses baixas têm principalmente um efeito imunomodulador e são utilizadas em paciente que têm um maior comprometimento do seu sistema imune. As doses médias fazem a imunomodulação e ainda a ativação do sistema enzimático antioxidante. Por último, as doses altas têm a capacidade de inibir mecanismos auto imunes e também são com estas que se fazem preparações terapêuticas de ozono como óleos e soluções salinas. Doses muito elevadas ou exposição muito prolongada ao O₃ têm efeitos genotóxicos (ISCO3, 2020).

Os óleos ozonizados, podem ser administrados via tópica ou oral. Estes, são feitos através do processo de ozonização de óleos vegetais como o de girassol e azeite, por exemplo (Floare et al. 2023; Sumida & Hayashi, 2022). A adição de O₃ nos óleos forma compostos de peróxido de hidrogénio (H₂O₂). O índice de peróxidos (IP) é a quantificação do valor destes compostos, que é maior quanto maior o tempo de contacto do óleo com o O₃ (Moureu et al., 2015).

Todos os pacientes respondem de diferente forma à ozonoterapia, como tal, é importante iniciar a terapia com doses baixas e mais tarde adequar a dose e/ou a via de administração (ISCO3, 2020).

1.2.1.1 Ação anti inflamatória

Uma das principais formas de atuação do O₃ é através da estimulação do Fator Nuclear Eritroide 2 (Nrf2) e inibição do Fator Nuclear kappa B (NF-κB). Quando em homeostase as respostas causadas por ambos os fatores estão equilibradas e existe um equilíbrio *redox* no organismo (Clavo et al., 2019; ISCO3, 2020; Serra et al., 2023).

A ativação da via Nrf2 promove a transcrição de elementos antioxidantes como a SOD, catálase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione S-Transferase (GST), Heme

Oxigenase-1 (HO-1) e as Proteínas de Choque Térmico (HSP) (Smith et al., 2017). A via NF- κ B ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL6, IL8 e ainda da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (Clavo et al., 2019; Liu et al., 2023). Ambas as vias têm responsabilidade na modulação da resposta inflamatória nos indivíduos, pelo que o seu equilíbrio ajuda nesta resposta (Clavo et al., 2019; Liu et al., 2023).

A ação anti-inflamatória ajuda não só no combate às doenças, mas também no manejo da dor associado. O O₃ está bem documentado como uma terapia de auxílio do manejo de dores de origem neurológica e ortopédica, permitindo por vezes a redução dos fármacos utilizados no manejo (Sciorsci et al., 2020; Serra et al., 2023).

1.2.1.2 Modulação de imunidade

Quando o O₃ entra em contacto com ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) forma compostos que ajudam na resposta imune, nomeadamente o H₂O₂ e produtos da lipoperoxidação (LOPs) (Sciorsci et al., 2020; Smith et al., 2017).

Em doses baixas, o H₂O₂ e LOPs, ao entrar em contacto com as células T, ativam a fosfolipase C, uma enzima que hidrolisa os constituintes da membrana celular que produzem os mensageiros secundários e por sua vez induzem a produção de IL2, TNF- α e IFN- γ . Além disso, doses baixas de O₃ aumentam a produção de macrófagos e leucócitos e induzem produção de NO que também ajuda na resposta imune (Liu et al., 2023; Sciorsci et al., 2020; Smith et al., 2017). Já doses muito elevadas de H₂O₂ circulantes bloqueiam a regulação desta resposta e causam processos degenerativos (Viebahn-Haensler & León Fernández, 2021).

1.2.1.3 Capacidade anti oxidante

A ozonoterapia com abordagem controlada e inicialmente em baixa dose permite uma resposta adaptativa ao stresse oxidativo, que está associado a um efeito terapêutico (Clavo et al., 2019). Apesar de ser uma molécula oxidante, o O₃ também consegue uma resposta antioxidante. Isto acontece porque a molécula, ao formar H₂O₂ e LOPs, causa a ativação da via Nrf2, que leva à produção de antioxidantes (Liu et al., 2023; Sciorsci et al., 2020; Smith et al., 2017).

1.2.1.4 Modulação hematológica e vascular

Como já mencionado, o O₃ induz a produção de NO. Esta molécula, não só tem efeito sobre a resposta imune, como também tem funções de controlo sobre o endotélio vascular.

Além do NO, o O₃ induz a produção de Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF), de Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF) e da prostaciclina (Sciorsci et al., 2020; Smith et al., 2017).

A exposição ao O₃ aumenta o nível de O₂ celular, que torna o ciclo de respiração mitocondrial mais eficiente, aumenta a taxa de glicólise e, desta forma, o oxigênio ligado à hemoglobina consegue ter uma distribuição para os tecidos isquêmicos mais eficiente (ISCO3, 2020; Smith et al., 2017). Esta perfusão também é auxiliada pela atividade do NO (Smith et al., 2017). Uma exposição prolongada ao O₃ e consequente produção de LOPs, permite uma interação destes com a medula óssea que estimula a eritropoiese (Smith et al., 2017).

1.2.1.5 Combate a doenças infecciosas

As propriedades bactericidas, viricidas e fungicidas do O₃ já estão descritas. Apenas o seu potencial antiparasitário começa a ser mais explorado e com boa evidência do seu uso em protozoários (Aghaei et al., 2019; Cabral et al., 2020; ISCO3, 2020). Uma das razões pelas quais a ozonoterapia demonstra atividade no combate a doenças infecciosas é a sua capacidade de modulação do sistema imune, como anteriormente mencionado (Liu et al., 2023).

No combate às bactérias o O₃ faz a oxidação dos lípidos e das lipoproteínas de membrana celular das mesmas, tendo acesso ao seu interior onde afeta a produção de enzimas, o metabolismo e causa danos do DNA, levando à morte (Aghaei et al., 2019; Liu et al., 2023). A ozonoterapia tem um bom efeito documentado em biofilmes, através do uso de soluções ozonizadas que permitem a sua destruição (Liu et al., 2023). O efeito está bem documentado em *Staphylococcus aureus*, incluindo os resistentes à metilicina (MRSA), *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e micobacterias (Liu et al., 2023).

Contra os vírus o O₃ consegue de forma semelhante às bactérias, destruir a sua cápsulide e interromper a sua replicação. O seu efeito contra herpes vírus simplex tipo 1 e coronavírus tipo 2 está documentado, observando-se nestes estudos que o uso conjunto com antivirais ajudou no tratamento (Cenci et al., 2022; Liu et al., 2023).

Nas infeções fúngicas, o O₃ entra no citoplasma destas células e interrompe os mecanismos celulares e a produção de esporos e de micotoxinas (Liu et al., 2023). A eficácia de tratamento varia para cada espécie de fungo e depende também do tempo e concentração de tratamento utilizados (Fernández et al., 2021). Espécies de *Candida*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*, são alguns exemplos da sua utilização (Fernández et al., 2021; Liu et al., 2023; Varol et al., 2022).

1.2.1.6 Cicatrização

A capacidade da ozonoterapia de tornar a circulação mais eficiente e de fazer modulação da resposta imune torna-a num bom método de auxílio na cicatrização. Ainda mais, o O₃ tem a capacidade de estimular a migração dos fibroblastos e de colagénio aos locais de lesão, que também ajudam neste processo (Liu et al., 2023).

1.2.2 Ozonoterapia na Leishmaniose Canina

A leishmaniose canina é uma doença crónica e são características de doenças crónicas altos níveis de stresse oxidativo e um sistema de antioxidantes insuficiente (Liu et al., 2023). Animais com leishmaniose sintomática têm caracteristicamente um desequilíbrio redox, causado pela produção ROS e espécies reativas de nitrogénio (RNS) (como o NO e iNO) por parte dos fagócitos e pelo alto consumo de antioxidantes na tentativa de neutralizar estes compostos (Maia & Campino, 2018; Otomaru et al., 2020).

A medição dos níveis de stresse oxidativo é importante em várias doenças e tem sido reportada tanto em medicina humana como em veterinária, pois permite saber o estado do paciente antes da implementação de tratamentos com O₃ ou antioxidantes. Além disto, a monitorização do stresse oxidativo permite compreender a eficácia dos tratamentos atuais nos pacientes e evolução da doença nos mesmos (Sechi et al., 2017; Smith et al., 2017). Os níveis de ROS não são fáceis de medir pois estes têm um curto período de vida e as técnicas de medição são complexas (Porato et al., 2023; Sechi et al., 2017). Como alternativa, podem avaliar-se os níveis de metabolitos reativos de oxigénio (ROM's) que são compostos que se formam a partir da interação de ROS com outras moléculas orgânicas (Sechi et al., 2017), como é o caso da interação com os PUFA's que geram H₂O₂ (Sciorsci et al., 2020; Smith et al., 2017).

Existe uma relação entre os níveis de ROS e RNS e os níveis de antioxidantes e como tal, devem ser avaliados em conjunto. A partir destes valores, conhecemos o nível de stresse oxidativo, avaliando o índice de stresse oxidativo (OSI), que se representa pela razão entre os valores de ROM's e antioxidantes (Candellone et al., 2019; Otomaru et al., 2020).

A ozonoterapia na LCan já tem vindo a ser utilizada com evidência médica e científica. Em 2020, Gonçalves et al., realizaram um protocolo de tratamento com domperidona e miltefosina em conjunto com ozonoterapia via intra retal, AHME e perilesional. Este protocolo, mostrou bons resultados no tratamento das lesões de pele, melhor resposta imune e menos efeitos secundários aos fármacos, bem como melhoria do estado geral.

Também neste ano, Cabral e colaboradores, observaram em murganhos infectados com *Leishmania amazonensis*, que em protocolos com antimoniato de meglumina mais ozono intra lesional, os animais recuperaram significativamente melhor das lesões. Ainda neste estudo, observou-se que o número de parasitas *in vitro*, expostos a uma solução ozonizada durante 72 horas reduziu, concluindo atividade leishmanicida *in vitro* do ozono. Na medicina humana também já existem estudos a comprovar a sua utilização especialmente no controle das lesões cutâneas (Aghaei et al., 2019).

Para a realização dos tratamentos com ozonoterapia, é importante saber o estado *redox* do paciente, uma vez que doses iniciais muito elevadas de O₃ podem agravar o quadro clínico (ISCO3, 2020). Desta maneira, os pacientes podem não ser elegíveis a ozonoterapia, sendo necessário fazer controle do stresse oxidativo com a toma de antioxidantes como a vitamina D e E, por exemplo (ISCO3, 2020; Sumida & Hayashi, 2022). Nestes casos, a toma dos suplementos deve ser anterior ao tratamento com ozono, pois durante e após o tratamento pode causar interferência com o mecanismo de ação do O₃ (ISCO3, 2020). Estes factos demonstram a importância de aferir os valores de stresse oxidativo e antioxidantes dos pacientes (Smith et al., 2017). A leishmaniose não é a única doença onde isto acontece, em cães já está documentado o desequilíbrio *redox* em condições como anemia, dermatite atópica, carcinoma mamário, lesões medulares e doença inflamatória intestinal (Porato et al., 2023). Contudo, em medicina veterinária, ainda não existem intervalos de referências para os parâmetros alterados nestas condições fisiológicas (Porato et al., 2023).

Em 2023, um estudo realizado por Porato et al., procurou completar a falta de informação acerca da avaliação do equilíbrio *redox* em cães. Aqui, foram avaliados alguns biomarcadores de stresse oxidativo em animais da raça Beagle, como a vitamina C, selénio, glutationala peroxidase, entre outros.

A utilização da ozonoterapia como adjuvante ao tratamento da leishmaniose tem um grande potencial na ajuda ao combate a esta doença que cada vez se demonstra mais difícil, devido às resistências aos fármacos que tendem a aparecer e ao aumento da prevalência da doença a nível mundial. A implementação desta terapia tem o potencial de reduzir as doses utilizadas atualmente no tratamento, e consequentemente os seus efeitos secundários associados (Kurami et al., 2023; Passero et al., 2018), e de ajudar na resposta imune, processo chave no combate à LCan (Toepp & Petersen, 2020).

A presente dissertação tem o intuito avaliar os níveis de oxidantes e antioxidantes em animais com leishmaniose, antes e após uma suplementação com cápsulas de ozono PO,

bem como as alterações nos parâmetros hematológicos dos animais. Desta forma, pretende-se não só avaliar a ozonoterapia como adjuvante ao tratamento da leishmaniose, mas também reforçar a importância da medição dos indicadores de stresse oxidativo previamente aos tratamentos. Esta última medida, permite não só a avaliar a possibilidade de implementação desta terapia, como também a evolução e impacto da doença nos animais. Além disto, este estudo, procura fornecer bibliografia à comunidade científica veterinária sobre parâmetros alterados sobre condições fisiológicas de stresse oxidativo.

2. Material e Métodos

O seguinte trabalho teve a aprovação pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Lisboa (FMV-ULusófona) (nº 31-2024).

2.1 Animais

Os animais participantes no estudo eram provenientes de 3 CAMV's diferentes, localizados na Área Metropolitana de Lisboa. Todos os animais infetados com LCan, mantiveram os protocolos farmacológicos que realizavam até aquele momento. Foram recolhidas amostras sanguíneas de 15 cães, 11 destes com diagnóstico confirmado de Leishmaniose Canina e 4 com teste negativo para a doença. Os animais com LCan, realizaram hemograma, bioquímicas séricas e análise de stresse oxidativo, previamente à instituição do protocolo (T0) e repetiram as mesmas análises após 30 dias $\pm$ 2 dias (T1). Os animais saudáveis realizaram estes mesmos exames, mas apenas em T0. Foram considerados os grupos:

- Grupo 1, animais doentes com LCan previamente a realização do protocolo (T0);
- Grupo 2, animais doentes com LCan após a realização do protocolo (T1);
- Grupo 3, animais saudáveis.

Os tutores dos animais foram informados de todos os procedimentos e assinaram termo de responsabilidade sobre os mesmos, tomando também conhecimento da possibilidade de desistência a qualquer momento. Os médicos veterinários responsáveis pelos animais, foram de igual forma, informados e concordaram com a instituição do protocolo. Foram apenas utilizados 13 animais, 9 dos quais com LCan e 4 livres da patologia pois, um dos tutores do animal desistiu do projeto e um outro foi excluído devido à sua condição clínica não relacionada com a leishmaniose, que se encontrava muito debilitada.

2.2 Hemograma e Bioquímicas

As amostras sanguíneas foram recolhidas por punção venosa, para tubos com anticoagulante ou heparina, para análise de hemograma e bioquímicas séricas, respetivamente. Foram colhidos aproximadamente 1mL para cada tubo e as amostras foram processadas no laboratório clínico do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona. Os parâmetros avaliados foram:

- No hemograma: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), distribuição de glóbulos vermelhos (RDW), plaquetas, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos;

- Nas bioquímicas: proteína total (PT), globulinas, albumina, creatinina, ureia, glucose e ALT.

Os valores de referência utilizados correspondem aos utilizados pelo laboratório clínico do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona. Todos os valores destes exames realizados podem ser consultados no Apêndice A.

2.3 Análise de stresse oxidativo

Para esta análise foram recolhidos, por punção venosa, aproximadamente 1mL de sangue para um tubo com heparina, que foi posteriormente centrifugado e separado o plasma para conservação a -80 C°. As amostras foram depois descongeladas e as medições foram realizadas no laboratório da 2MPharma, com o aparelho Free Radical Analytical System (FRAS 5) da Health & Diagnostics srl® (H&D s.r.l®), de acordo com o protocolo disponibilizado pela entidade produtora (Anexo B), à exceção da recolha que foi adaptada à espécie. Os parâmetros avaliados foram os metabolitos reativos de oxigénio dinâmicos (d-ROMS), o PAT, do inglês *Plasma Antioxidant Test*, ou seja, o nível de antioxidantes no plasma, e o índice de stresse oxidativo (OSI).

2.4 Protocolo de Ozonoterapia

O protocolo instituído consistiu na toma diária, por parte dos cães positivos para leishmaniose, de uma cápsula do suplemento alimentar OXXY O3® [*Olea europaea* L. (ext. seco padronizado a 7% hidroxitirosol) - 100 mg; *Helianthus annuus* (óleo) - 100 mg e Zinco - 5mg (50% VRN) - 7mg/kg] durante 30 dias ininterruptos. A escolha produto ocorreu porque não existe congénere para uso veterinário. As cápsulas apresentam um nível de IP de 600.

2.5 Análise estatística

A análise das médias e desvios padrão foi realizada no Microsoft Excel 2013. Para a avaliação da significância dos resultados foi realizado o teste t em conjunto com o teste de Kolmogorov-Smirnov (ou teste KS) para avaliação da normalidade das variáveis, entre os animais doentes, antes e após suplementação com ozono. Entre os três grupos foi realizado o teste ANOVA unidirecional. Todos os testes foram realizados no *software GraphPad Prism* versão 10.3.0. A escolha dos testes foi realizada com base no tamanho das amostras, e o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$ para os testes t emparelhado e ANOVA unidirecional, e de $p > 0,10$ para o teste KS.

3. Resultados

O estudo presente contou com um total de 13 canídeos, 9 com LCan e 4 saudáveis e sem a doença. A média dos pesos dos animais doentes foi de $29 \pm 12,5$ Kg enquanto que a dos animais saudáveis $25,5 \pm 6,3$ Kg.

A análise dos resultados do teste t e teste KS, dos exames realizados nos grupos 1 e 2 permitiu, primeiramente, observar que todos os parâmetros se encontravam com distribuição normal, uma vez que o valor de p do teste KS era superior a 0,10 em todos (Tabela 1). Em relação à análise do teste t ao eritrograma, não se verificou significância nos resultados de hematócrito ($p=0,5060$), eritrócitos ($p=0,3283$), hemoglobina ($p=0,5490$), VCM ($p=0,7839$), CHCM ($p=0,1012$), RDW ($p=0,3351$) e plaquetas ($p=0,8466$) (Tabela 1). Relativamente à análise do leucograma, houve registo de significância estatística dos valores de neutrófilos ($p=0,0491$). O valor médio passou de $6,04 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 2,42$, para $5,8 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 0,84$ (Gráfico 5). Nos restantes parâmetros não se observou este registo, nomeadamente, nos leucócitos ($p=0,1677$), linfócitos ($p=0,1977$), eosinófilos ($p=0,0517$), monócitos ($p=0,1293$) e basófilos ($p=0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1- Resultados dos testes estatísticos em relação ao hemograma, na avaliação do protocolo entre os grupos 1 e 2.

Parâmetro de Hemograma	Teste t	Teste KS
Hematócrito	0,5060	0,16
Eritrócitos	0,3283	0,48
Hemoglobina	0,5490	0,28
VCM	0,7839	0,26
CHCM	0,1012	0,24
RDW	0,3351	0,2
Plaquetas	0,8466	0,18
Leucócitos	0,1677	0,25
Neutrófilos	0,0491*	0,25
Linfócitos	0,1977	0,18
Eosinófilos	0,0517	0,23
Monócitos	0,1293	0,22
Basófilos	0,05	0,28

Nota: Valores assinalados com (*) representam resultados estatisticamente relevantes.
Valor p considerado para o teste t $p < 0,05$ e para o teste KS $p > 0,10$.

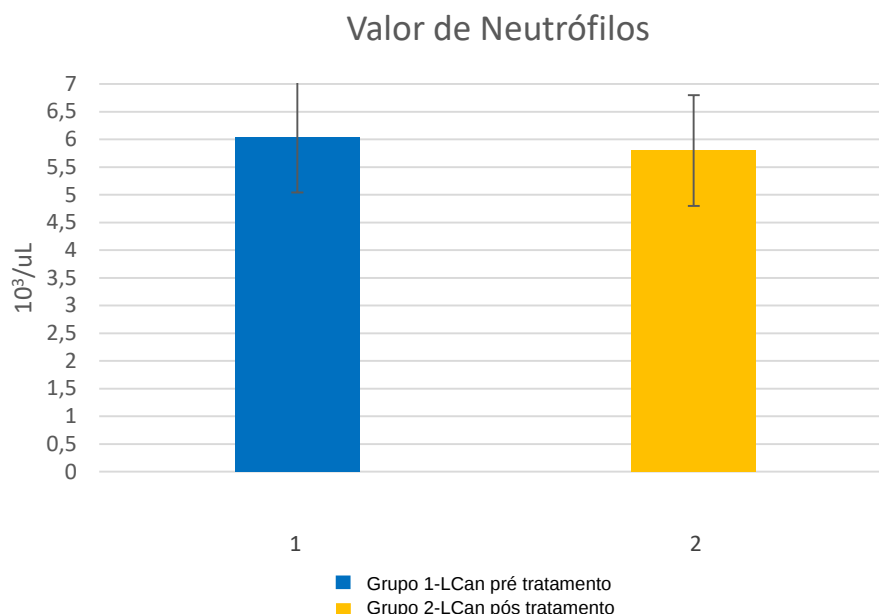


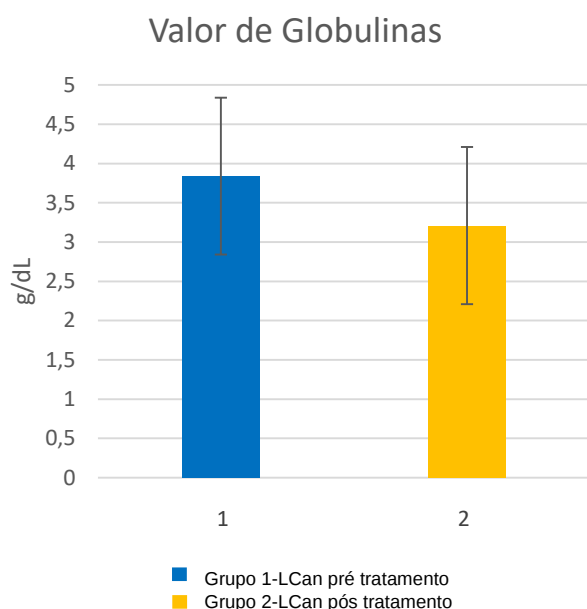
Gráfico 5- Valor de média de neutrófilos antes e após realização do protocolo.

Quanto às análises bioquímicas observou-se, mais uma vez, que, todos os parâmetros se encontravam com distribuição normal e valor de p para o teste KS superior a 0,10 em todos. Ainda, pode observar-se que houve alteração significativa nos valores de globulinas ($p=0,0329$) e albumina ($p=0,0076$). Houve uma redução dos níveis de globulinas de $3,84 \text{ g/dL} \pm 1,08$, para $3,21 \text{ g/dL} \pm 0,86$, e nos níveis de albumina observou-se um aumento dos valores de $2,91 \text{ g/dL} \pm 0,33$, para $3,41 \text{ g/dL} \pm 0,42$ (Gráfico 6). Contrariamente, os restantes parâmetros não mostraram resultados estatisticamente relevantes, PT ($p=0,2993$), creatinina ($p=0,2517$), ureia ($p=0,5818$), glicose ($p=0,2528$) e ALT ($p=0,1495$) (Tabela 2).

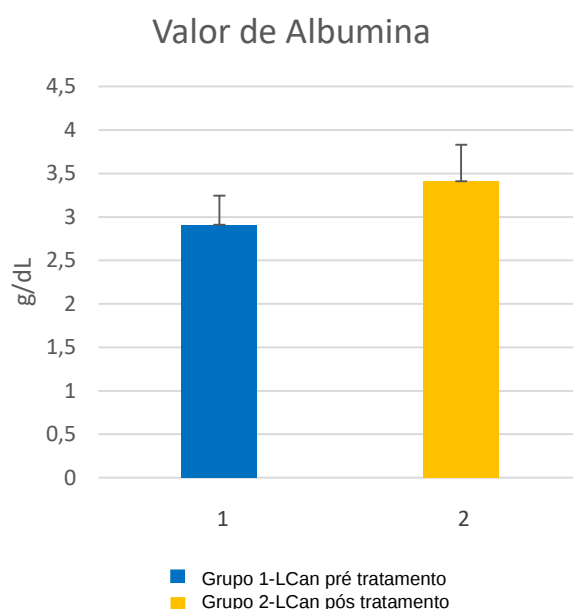
Tabela 2- Resultados dos testes estatísticos em relação às análises bioquímicas, na avaliação do protocolo entre os grupos 1 e 2.

Parâmetro Bioquímico	Teste t	Teste KS
PT	0,2993	0,18
Globulinas	0,0329*	0,21
Creatinina	0,2517	0,18
Ureia	0,5818	0,27
Glicose	0,2528	0,21
ALT	0,1495	0,28
Albumina	0,0076*	0,20

Nota: Valores assinalados com (*) representam resultados estatisticamente relevantes.
Valor p considerado para o teste t $p < 0,05$ e para o teste KS $p > 0,10$.



6A- Valores de média e desvio padrão de globulinas dos grupos 1 e 2.



6B- Valores de média e desvio padrão de albumina dos grupos 1 e 2;

Gráfico 6- Valor de média de globulinas e albumina antes e após realização do protocolo.

Por fim, entre os grupos 1 e 2, os valores de p de d-ROMs ($p=0,7047$), PAT ($p=0,1603$) e OSI redox ($p=0,8383$), mostraram que não existiu diferença estatística significativa dos animais afetados pelo protocolo instituído (Tabela 3).

Tabela 3- Resultados dos testes estatísticos em relação ao *stress* oxidativo, na avaliação do protocolo entre os grupos 1 e 2.

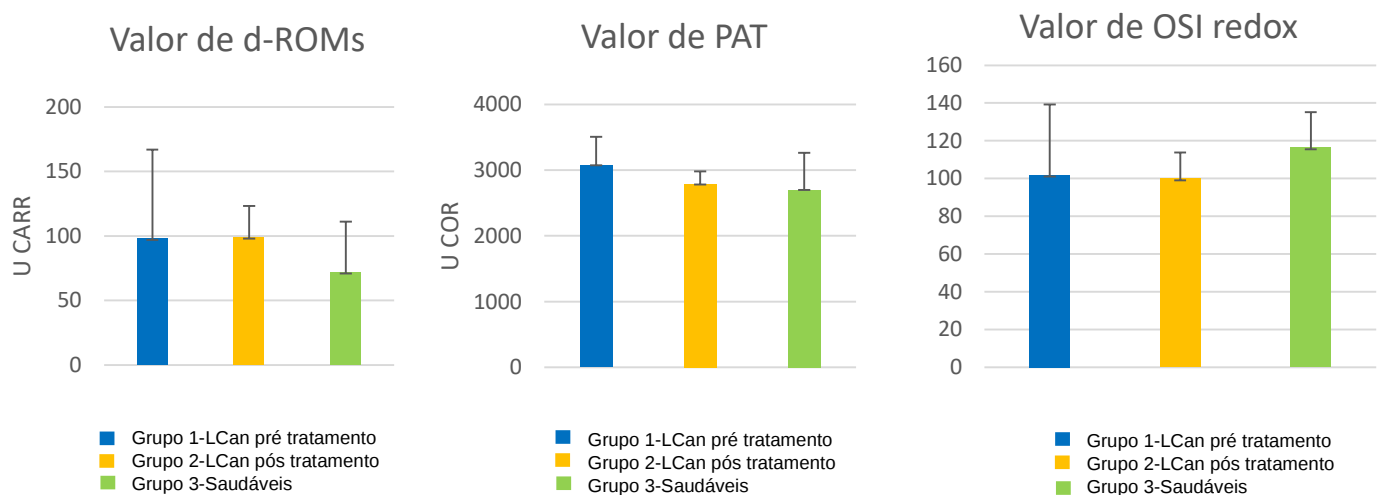
Análise de stresse oxidativo	Teste t	Teste KS
d-ROMs	0,7047	0,16
PAT	0,1603	0,24
OSI redox	0,8383	0,16

Nota: Valor p considerado para o teste t $p<0,05$ e para o teste KS $p>0,10$.

A análise do teste ANOVA unidirecional, englobou os grupos 1, 2 e 3 e incluiu análise de hemograma, bioquímicas e stresse oxidativo. Nenhum dos parâmetros avaliados demonstrou alterações que indiquem diferenças significativas entres os três grupos: hematócrito $p=0,3316$; eritrócitos $p=0,1869$; hemoglobina $p=0,2939$; VCM $p=0,6556$; CHMC, $p=0,1092$; RDW, $p=0,1559$; plaquetas, $p=0,6264$; leucócitos, $p=0,5339$; neutrófilos, $p=0,3499$;

linfócitos, $p=0,5593$; eosinófilos, $p=0,1535$; monócitos, $p=0,3887$; basófilos, $p=0,9480$; PT, $p=0,4111$; globulinas $p=0,1359$; creatinina $p=0,7647$; ureia $p=0,3538$; glicose $p=0,2339$; ALT $p=0,2387$; albumina $p=0,1559$; d-ROMs, $p=0,3261$; PAT, $p=0,3262$; OSI redox, $p=0,2424$ (Apêndice B).

Todos os valores obtidos de d-ROMs, PAT e OSI redox, encontram-se no apêndice C. Os valores médios no Grupo 1 foram de $98 \pm 68,89$ Carratelli Units (U CARR) para d-ROMs, $3074 \pm 432,24$ Cornelli Units (U COR.) para o PAT e $102 \pm 37,31$ para OSI redox. No Grupo 2 $99 \pm 24,33$ U CARR para d-ROMs, $2784 \pm 194,93$ U COR, para PAT e $100 \pm 13,82$ para OSI redox. Por último no Grupo 3 $72 \pm 39,05$ U CARR para d-ROMs; $2698,5 \pm 565,82$ U COR. para PAT e $116,5 \pm 18,73$ para OSI redox (Gráfico 7).



5A- Valores de média e desvio padrão de d-ROMs dos grupos 1, 2 e 3;

5B- Valores de média e desvio padrão de PAT dos grupos 1, 2 e 3;

5C- Valores de média e desvio padrão de OSI redox dos grupos 1, 2 e 3.

Gráfico 7- Resumo dos valores de média e desvio padrão de d-ROMs, PAT e OSI redox..

4. Discussão

Segundo a OMS, a leishmaniose é uma das principais zoonoses negligenciadas no mundo (Pires et al., 2019). No tratamento desta patologia o equilíbrio da resposta imunológica é essencial para um manejo eficaz (Toepp & Petersen, 2020). A pesquisa por novos métodos de tratamento para a leishmaniose canina surge devido ao aumento da sua incidência mundial e das resistências associadas aos fármacos atualmente utilizados (Kurami et al., 2023; Passero et al., 2018). Já existe inúmera evidência científica que relata resistências farmacológicas aos principais princípios ativos utilizados na LCan, nomeadamente alopurinol, miltefosina e antimonio de meglumina (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Bockstal et al., 2020; Morales-Yuste et al., 2022; Yasur-Landau et al., 2017).

Nesta dissertação, procedeu-se à avaliação de alterações no stresse oxidativo e parâmetros hematológicos, em animais portadores de LCan, sobre o efeito de suplementação oral com ozono sob a forma de óleo ozonizado. Assim, procurou-se estudar o efeito desta suplementação nestes animais e realçar a importância da avaliação do stresse oxidativo em pacientes não só padecentes de LCan, mas também de outras doenças crônicas. Esta avaliação contribuiu não só de forma a otimizar os tratamentos fornecidos, mas também para o estudo de desenvolvimento de valores de intervalo de referência para os parâmetros de d-ROMs, PAT e OSI *redox*.

A pesquisa demonstrou em relação ao hemograma alterações significativas nos valores de neutrófilos nos Grupos 1 e 2. Na infeção por *L. infantum*, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas, que posteriormente, irão levar produção de TNF- α e IFN- γ (Ivănescu et al., 2023; Toepp & Petersen, 2020). A constante chamada deste tipo de células cria um ambiente pró-inflamatório e o aumento do nível de neutrófilos é por isso, expectável (Gonçalves et al., 2019). As citocinas TNF- α e IFN- γ têm um papel na modulação da resposta imunitária, uma vez que estimulam a produção de macrófagos, que são responsáveis pelo principal mecanismo de eliminação do parasita, a produção de NO, iNOS e ROS (Cabral et al., 2021; Ivănescu et al., 2023; Maia & Campino, 2018). Estes compostos, através de um dano a nível mitocondrial, levam a uma lesão metabólica fatal para *L. infantum* (Cabral et al., 2021). O O₃ faz modulação das vias Nrf2 e NF-kB, que ativam a produção de TNF- α e IFN- γ , que vão então cumprir o seu papel no combate à LCan (Clavo et al., 2019; Liu et al., 2023; Serra et al., 2023). Além disso, a ozonoterapia induz a produção de ROS (Cenci et al., 2022) que como já mencionado, leva à eliminação do parasita. Estes dois mecanismos, poderão ter contribuído para a diminuição do valor de neutrófilos nestes animais, uma vez que a sua função foi auxiliada com a introdução do ozono, o que pode ter reduzido o recrutamento destas

células e contribuindo para uma modelação da resposta imunitária. Quanto aos restantes valores de hemograma, não foi possível observar eficácia do protocolo instituído.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos, permitiu concluir que os valores de globulinas e albumina apresentaram diferença estatística significativa, entre os Grupos 1 e 2. Tanto a hiperglobulinemia como a hipoalbuminemia são achados comuns em cães infetados com LCan (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Maia & Campino, 2018). No presente estudo observou-se que os níveis de globulinas tiveram tendência a diminuir e os de albumina a aumentar, com significância de $p=0,0329$ para a globulina e $p=0,0076$ para a albumina. Quando *L. infantum* entra em circulação no fígado, as células de Kupffer, que são uma das maiores populações de macrófagos no organismo, localizadas no fígado, iniciam a resposta contra o patógeno (Rodrigues et al., 2017). Esta resposta, que envolve fagocitose e recrutamento de outros mediadores inflamatórios, por vezes atinge níveis excessivos, característicos da LCan e induz lesões a nível hepático (Rodrigues et al., 2017). Estudos realizados, já demonstraram uma relação entre a hiperplasia das células de Kupffer e o aumento do nível de globulinas e diminuição do nível de albumina (Giunchetti et al., 2008; Lima et al., 2019). Como já mencionado, o O_3 quando administrado, leva à formação de ROS, compostos estes que permitem a eliminação do parasita *L. infantum*. Este mecanismo, auxilia a resposta dos macrófagos e por essa razão, pode ter levado ao melhor controlo do parasita com menos necessidade de recrutamento de células de Kupffer, levando à diminuição do dano hepático que causa as alterações a nível das proteínas mencionadas.

A pesquisa sobre a eficácia da ozonoterapia em doenças causadas por protozoários, como é o caso da leishmaniose canina, é ainda muito recente (Aghaei et al., 2019; Cabral et al., 2020; ISCO3, 2020). Já apresenta boas evidências em melhorias de sinais clínicos cutâneos quando usada sobre forma local ou sistémica (por via retal ou AHME) (Gonçalves et al., 2020; Cabral et al., 2020), no entanto a eficácia da toma oral carece de mais pesquisa. A escolha de administração por via oral em forma de cápsula, foi ponderada pela sua facilidade de administração em animais, em comparação com a utilização de óleo por gotas, uma vez que permite uma dose certa. A realização do tratamento aos animais foi feita pelos seus tutores. Alguns destes, referiram que por vezes tiveram dificuldade na administração das cápsulas por inteiro e ofereceram o conteúdo juntamente com comida. Razões como o tamanho da cápsula em proporção ao animal e facilidade em aceitação de medicação oral pelo animal, foram apresentadas como justificação. A empresa produtora do produto, aconselha a administração das cápsulas inteiras para melhor absorção a nível do estômago, mas refere que na impossibilidade de o fazer, o produto pode ser administrado misturando-o na ração do animal. Além disto, devido à disponibilidade dos tutores em vir a consulta com o

animal, o tratamento programado para 30 dias era por vezes encurtado cerca de um a dois dias, ou a repetição da análise adiada entre 1 a 2 dias. Ademais, o desvio padrão da média de peso dos animais doentes foi de 12,5 Kg, que demonstra uma grande variação do peso dos participantes. Futuramente seria interessante, a repetição deste estudo mas com maior controlo sobre variáveis como o peso dos animais, a dose utilizada conforme o peso, a forma de administração das cápsulas e tempo de protocolo mais rigoroso.

O óleo contido nas cápsulas administradas tinha um valor de 600 IP. Segundo a ISCO3 (2020), na utilização de óleos intra lesionalmente, na leishmaniose, devemos começar por uma dose de 400 IP, aumentar para 600 IP e mais tarde para 800 IP, se for observada uma resposta positiva a cada dose utilizada. Uma dose de 600 IP encaixaria-se numa dose média de O_3 , que varia de 400 a 600 IP, a dose baixa, que varia de 200 a 400 IP e a alta que varia de 800 a 1200 IP (ISCO3, 2020). Doses mais reduzidas de ozono permitem uma modulação das vias Nrf2 e NF- κ B, como uma resposta adaptativa, que melhora a resposta imune do organismo (Clavo et al., 2019; ISCO3, 2020). A escolha de IP neste trabalho foi considerada adequada à patologia, mas seria interessante a realização de um estudo com maior duração em que se iniciasse a terapia com um nível de 400 IP, que fosse mais tarde aumentado para 600, e observar a resposta do organismo a este tipo de estimulação mais gradual.

Era expectável observar um aumento do valor de PAT nos animais doentes após a realização da suplementação com O_3 . Isto acontece porque o O_3 , ao formar H_2O_2 e LOPs quando em contacto com PUFA's, causa a ativação da via Nrf2, que leva à produção de antioxidantes (Liu et al., 2023; Sciorsci et al., 2020; Smith et al., 2017). Uma possível causa para tal não ter acontecido pode ser o nível de debilitação dos animais, que, ao invés de estimular a produção de antioxidantes como resposta à administração de um oxidante, não teve resposta ou piorou o nível destes compostos. Outro fator que pode ter contribuído para esta resposta é o nível de IP do óleo utilizado. Como já mencionado níveis reduzidos de IP permitem uma melhor resposta adaptativa do organismo ao O_3 , o que leva a ponderar iniciar tratamento com uma dose mais baixa. A resposta observada nos níveis de PAT é de importante consideração uma vez que reforça a importância da compreensão do estado redox dos animais previamente aos tratamentos. Isto pode ser considerado em futuros estudos para a definição de critérios de exclusão. Além disto, este facto também reforça a importância da instituição de suplementação com antioxidantes como vitamina D e E previamente à ozonoterapia, para preparar o organismo e permitir uma resposta mais eficaz à terapia (ISCO3, 2020; Sumida & Hayashi, 2022).

Atualmente existe pouca e discordante bibliografia disponível sobre o intervalo de valores de referência de parâmetros de avaliação de stresse oxidativo em medicina veterinária (Porato et al.,2023). Em 2023, uma pesquisa realizada por Porato et al., procurou completar a informação existente sobre alguns destes parâmetros, mas não englobou a pesquisa de nenhum dos parâmetros avaliados nesta dissertação, incidindo mais sobre a avaliação de antioxidantes. Um outro artigo de Sechi et al., 2015, menciona um intervalo de valores normais de referência na medicina veterinária de d-ROMs 50-90 U.CARR, 92-95 U.CARR próximo do limiar, stresse oxidativo leve 100-120 U.CARR, stresse oxidativo 140-200 U.CARR, forte nível de stresse oxidativo 220-300 e >300 U.CARR. As médias de valores obtidos neste estudo foram, para o Grupo 1 de $98 \pm 68,89$ U.CARR, para o Grupo 2, $99 \pm 24,33$ U.CARR e para o Grupo 3, $72 \pm 39,05$ U.CARR. Comparando com o estudo de Sechi e colaboradores em 2015, os animais com leishmaniose neste estudo, tanto antes como após o tratamento, têm uma média de valores perto do valor considerado stresse oxidativo leve. Contrariamente, mas como esperado, os animais saudáveis encontram-se dentro dos valores normais de referência, considerados nesse estudo.

A realização do teste ANOVA unidirecional entre os três grupos não revelou alterações significativas de nenhum dos parâmetros de stresse oxidativo, apesar de estas já estarem descritas por vários autores como Gonçalves et al.,2021, Maia & Campino, 2018 e Pugliese et al., 2021. Estes resultados, bem como os resultados do teste ANOVA unidirecional para os parâmetros de hemograma e bioquímicas, poderão advir da principal limitação deste estudo, um n reduzido. Um maior número de participantes no estudo daria mais poder estatístico.

O estudo sobre os parâmetros d-ROMs, PAT e OSI redox, em veterinária ainda é muito reduzido. O trabalho realizado nesta dissertação fornece mais informação sobre os mesmos. Os valores obtidos poderão ser considerados em futuras pesquisas e possivelmente utilizados para a definição de valores *guideline* em medicina veterinária, mais especificamente, em cães.

5. Conclusão

O presente estudo permitiu reforçar a informação já existente sobre o efeito imuno modelador da ozonoterapia, em concreto a sua ação na leishmaniose canina.

Aqui observou-se que um protocolo de suplementação oral com cápsulas de óleo ozonizado, permitiu a diminuição no número de neutrófilos e globulinas e o aumento do valor de albumina nos animais com LCan.

Em relação à resposta dos parâmetros de stresse oxidativo a este protocolo, o estudo reforça a importância da sua avaliação previamente à instituição da suplementação com O_3 , demonstrando que os animais com desequilíbrio redox, podem não estar preparados para receber este tratamento, sem um equilíbrio prévio desse estado redox com antioxidantes.

Ademais, o estudo fornece sugestões à indústria sobre o desenvolvimento de suplementos de O_3 adaptados à medicina veterinária, nomeadamente às diferentes espécies e portes de animais.

Este trabalho permite ainda um maior conhecimento sobre os valores dos parâmetros de stresse oxidativo em cães, nomeadamente dos d-ROMs, PAT e OSI redox, fornecendo à comunidade científica veterinária dados para a criação de intervalos de referência de valores em cães.

É importante ressaltar que uma maior amostra de estudo, representa resultados potencialmente mais esclarecedores e evidentes, e que por essa razão é incentivada a realização de estudos neste sentido.

A ozonoterapia volta a mostrar ser uma terapia adjuvante com potencial no combate a doenças, em específico à leishmaniose canina. O seu potencial de reforço de resposta imune, o não desenvolvimento de resistências a esta terapia e as inúmeras formas de administração, tornam-na uma importante vertente a considerar na medicina veterinária.

6. Referências Bibliográficas

Aviso n.º 10663/2024/2 (2024) Diário da República n.º 96/2024, Série II de 2024-05-17. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/aviso/10663-2024-865171166>

Aghaei, M., Aghaei, S., Sokhanvari, F., Ansari, N., Hosseini, S. M., Mohaghegh, M. A., & Hejazi, S. H. (2019). The therapeutic effect of ozonated olive oil plus glucantime on human cutaneous leishmaniasis. *Iranian journal of basic medical sciences*, 22(1), 25–30. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.29232.7064>

Alishvandi, M., Bahrami, S., Rashidi, S., & Hatam, G. (2024). Isoenzyme characterization of *Leishmania infantum* toward checking the antioxidant activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase. *BMC infectious diseases*, 24(1), 208. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09069-7>

Almeida, M., Maia, C., Cristóvão, J. M., Morgado, C., Barbosa, I., Ibars, R. F., Campino, L., Gonçalves, L., & Cortes, S. (2022). Seroprevalence and Risk Factors Associated with *Leishmania* Infection in Dogs from Portugal. *Microorganisms*, 10(11), 2262. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112262>

Amaro, F., Vilares, A., Martins, S., Reis, T., Osório, H. C., Alves, M. J., & Gargaté, M. J. (2023). Co-Circulation of *Leishmania* Parasites and Phleboviruses in a Population of Sand Flies Collected in the South of Portugal. *Tropical medicine and infectious disease*, 9(1), 3. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9010003>

Baneth, G., & Solano-Gallego, L. (2022). Leishmaniasis. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 52(6), 1359–1375. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.06.012>

Bastos, D. S. S., Silva, A. C., Novaes, R. D., Souza, A. C. F., Santos, E. C., Gonçalves, R. V., & Marques-Da-Silva, E. A. (2022). Could combination chemotherapy be more effective than monotherapy in the treatment of visceral leishmaniasis? A systematic review of preclinical evidence. *Parasitology*, 1–14. Advance online publication. <https://doi.org/10.1017/S0031182022000142>

Cabral, F. V., Pelegrino, M. T., Seabra, A. B., & Ribeiro, M. S. (2021). Nitric-oxide releasing chitosan nanoparticles towards effective treatment of cutaneous leishmaniasis. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 113-114, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2021.04.008>

Cabral, I. L., Utzig, S. L., Banhuk, F. W., Staffen, I. V., Loth, E. A., de Amorim, J. P. A., Negretti, F., Gandra, R. F., Ayala, T. S., & Menolli, R. A. (2020). Aqueous ozone therapy improves the standard treatment of leishmaniasis lesions in animals leading to local and

systemic alterations. *Parasitology research*, 119(12), 4243–4253.

<https://doi.org/10.1007/s00436-020-06925-8>

Cacheiro-Llaguno, C., Parody, N., Escutia, M. R., & Carnés, J. (2021). Role of Circulating Immune Complexes in the Pathogenesis of Canine Leishmaniasis: New Players in Vaccine Development. *Microorganisms*, 9(4), 712. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040712>

Candellone, A., Gianella, P., Ceccarelli, L., Raviri, G., Badino, P., Roncone, S., Kooistra, H. S., & Meineri, G. (2019). Redox unbalance in the hyperthyroid cat: a comparison with healthy and non-thyroidal diseased cats. *BMC veterinary research*, 15(1), 136.

<https://doi.org/10.1186/s12917-019-1896-7>

Cavalera, M. A., Gernone, F., Uva, A., D'Ippolito, P., Roura, X., Paltrinieri, S., & Zatelli, A. (2021). Effect of domperidone (leisguard®) on antibody titers, inflammatory markers and creatinine in dogs with leishmaniosis and chronic kidney disease. *Parasites & vectors*, 14(1), 525. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05030-8>

Cenci, A., Macchia, I., La Sorsa, V., Sbarigia, C., Di Donna, V., & Pietraforte, D. (2022). Mechanisms of Action of Ozone Therapy in Emerging Viral Diseases: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Advantages With Reference to SARS-CoV-2. *Frontiers in microbiology*, 13, 871645. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.871645>

Centers for Disease Control and Prevention (2017, Dezembro, 14) *Leishmaniasis*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

Clavo, B., Rodríguez-Esparragón, F., Rodríguez-Abreu, D., Martínez-Sánchez, G., Llontop, P., Aguiar-Bujanda, D., Fernández-Pérez, L., & Santana-Rodríguez, N. (2019). Modulation of Oxidative Stress by Ozone Therapy in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Toxicity: Review and Prospects. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(12), 588. <https://doi.org/10.3390/antiox8120588>

E. Green C. (2012) *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4th ed.) pp.734-748. Elsevier

European Centre for Disease Prevention and Control (2020, Junho,15). *Phlebotomine sand flies - Factsheet for experts*. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies>

Fernández, J., Del Valle Fernández, I., Villar, C. J., & Lombó, F. (2021). Combined laser and ozone therapy for onychomycosis in an in vitro and ex vivo model. *PloS one*, 16(6), e0253979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253979>

Floare, A. D., Dumitrescu, R., Alexa, V. T., Balean, O., Szuhaneck, C., Obistoiu, D., Cocan, I., Neacsu, A. G., Popescu, I., Fratila, A. D., & Galuscan, A. (2023). Enhancing the Antimicrobial Effect of Ozone with *Mentha piperita* Essential Oil. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(5), 2032. <https://doi.org/10.3390/molecules28052032>

García-Castro, A., Egui, A., Thomas, M. C., & López, M. C. (2022). Humoral and Cellular Immune Response in Asymptomatic Dogs with Visceral Leishmaniasis: A Review. *Vaccines*, 10(6), 947. <https://doi.org/10.3390/vaccines10060947>

Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Carneiro, C. M., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Marques, M. J., Tafuri, W. L., & Reis, A. B. (2008). Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Research in veterinary science*, 84(2), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.04.020>

Gizzarelli, M., Foglia Manzillo, V., Inglese, A., Montagnaro, S., & Oliva, G. (2023). Retrospective Long-Term Evaluation of Miltefosine-Allopurinol Treatment in Canine Leishmaniosis. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 12(7), 864. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070864>

Gonçalves B., Castro L., Pinto H. & Filho M. (2020) Adjuvant therapy using ozonated saline in a dog with persistent thrombocytopenia - case report. *Research Society and Development*, 9(9) <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7234>

Gonçalves, A. A. M., Leite, J. C., Resende, L. A., Mariano, R. M. D. S., Silveira, P., Melo-Júnior, O. A. O., Ribeiro, H. S., de Oliveira, D. S., Soares, D. F., Santos, T. A. P., Marques, A. F., Galdino, A. S., Martins-Filho, O. A., Dutra, W. O., da Silveira-Lemos, D., & Giunchetti, R. C. (2019). An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 427. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00427>

Gonçalves, J. O. S., Paiva, P. de O., & Oliveira, L. B. G. de. (2020). Uso da ozonioterapia como auxiliar no tratamento de cão portador de leishmaniose: Relato de caso. *Pubvet*, 14(1). <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n1a495.1-4>

Gonçalves, R., de Pinho, F. A., Dinis-Oliveira, R. J., Mendes, M. O., de Andrade, T. S., da Silva Solcà, M., Lorangeira, D. F., Silvestre, R., & Barrouin-Melo, S. M. (2021). Nutritional adjuvants with antioxidant properties in the treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary parasitology*, 298. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109526>

International Scientific Committee of Ozone Therapy (2020). *Declaração de Madrid na Ozonoterapia*, (3rd ed.) Disponível em www.isco3.org.

Ivănescu, L., Andronic, B. L., Grigore-Hristodorescu, S., Martinescu, G. V., Mîndru, R., & Miron, L. (2023). The immune response in canine and human leishmaniasis and how this influences the diagnosis- a review and assessment of recent research. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1326521. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1326521>

Kozat S. & Okman N. E. (2019) Has Ozone Therapy a Future in Veterinary Medicine. *Journal of Animal Husbandry and Dairy Science*, 3 (3) ISBN: 2637-5354

Kumari, P., Mamud, A., & Jha, A. N. (2023). Review on the Drug Intolerance and Vaccine Development for the Leishmaniasis. *Current drug targets*, 24(13), 1023–1031. <https://doi.org/10.2174/0113894501254585230927100440>

Lima, I. S., Solcá, M. S., Tafuri, W. L., de Freitas, L. A. R., & Dos-Santos, W. L. C. (2019). Assessment of histological liver alterations in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasites & vectors*, 12(1), 487. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3723-1>

Liu, L., Zeng, L., Gao, L., Zeng, J., & Lu, J. (2023). Ozone therapy for skin diseases: Cellular and molecular mechanisms. *International wound journal*, 20(6), 2376–2385. <https://doi.org/10.1111/iwj.14060>

Maia, C., & Campino, L. (2018). Biomarkers Associated With *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 302. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00302>

Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J., & Corpas-Lopez, V. (2022). Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Veterinary sciences*, 9(8), 387. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080387>

Moureu, S., Violleau, F., Ali Haimoud-Lekhal, D., & Calmon, A. (2015). Ozonation of sunflower oils: impact of experimental conditions on the composition and the antibacterial activity of ozonized oils. *Chemistry and physics of lipids*, 186, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.01.004>

Nogales, C. G., Ferrari, P. H., Kantorovich, E. O., & Lage-Marques, J. L. (2008). Ozone therapy in medicine and dentistry. *The journal of contemporary dental practice*, 9(4), 75–84. <http://dx.doi.org/10.5005/jcdp-9-4-75>

- Noli, C., & Saridomichelakis, M. N. (2014). An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Veterinary journal* (London, England : 1997), 202(3), 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.00>
- Orlandin, J. R., Machado, L. C., Ambrósio, C. E., & Travagli, V. (2021). Ozone and its derivatives in veterinary medicine: A careful appraisal. *Veterinary and animal science*, 13, 100191. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100191>
- Oros, N. V., Repciuc, C., Ober, C., Peştean, C., Mircean, M. V., & Oana, L. I. (2023). Clinical Evaluation of Medical Ozone Use in Domestic Feline Cutaneous Wounds-A Short Case Series. *Animals : an open access journal from MDPI*, 13(17), 2796. <https://doi.org/10.3390/ani13172796>
- Otomaru, K., Oishi, S., Fujimura, Y., Iwamoto, Y., Nagai, K., & Ijiri, M. (2020). Effects of Vitamin C Supplementation on The Blood Oxidative Stress and Antibody Titre Against *Histophilus Somni* Vaccination in Calves. *Journal of veterinary research*, 65(1), 73–78. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0002>
- Paltrinieri, S., Gradoni, L., Roura, X., Zatelli, A., & Zini, E. (2016). Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary clinical pathology*, 45(4), 552–578. <https://doi.org/10.1111/vcp.12413>
- Parody, N., Cacheiro-Llaguno, C., Osuna, C., Renshaw-Calderón, A., Alonso, C., & Carnés, J. (2019). Circulating immune complexes levels correlate with the progression of canine leishmaniosis in naturally infected dogs. *Veterinary parasitology*, 274, 108921. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108921>
- Passero, L. F. D., Cruz, L. A., Santos-Gomes, G., Rodrigues, E., Laurenti, M. D., & Lago, J. H. G. (2018). Conventional Versus Natural Alternative Treatments for Leishmaniasis: A Review. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(15), 1275–1286. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181002114448>
- Pires, H., Martins, M., Matos, A. C., Cardoso, L., Monteiro, F., Roque, N., Nunes, T., Gottstein, B., & Cortes, H. (2019). Geospatial analysis applied to seroepidemiological survey of canine leishmaniosis in east-central Portugal. *Veterinary parasitology*, 274, 108930. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108930>
- Porato, M., Noël, S., Pincemail, J., Albert, A., Cheramy-Bien, J. P., Le Goff, C., & Hamaide, A. (2023). Selected biomarkers of oxidative stress in healthy Beagle dogs: A preliminary

study. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1063216.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1063216>

Priolo, V., Martínez-Orellana, P., Pennisi, M. G., Raya-Bermúdez, A. I., Jurado-Tarifa, E., Masucci, M., Donato, G., Bruno, F., Castelli, G., & Solano-Gallego, L. (2022). *Leishmania infantum* Specific Humoral and Cellular Immune Responses in Cats and Dogs: A Comparative Cross-Sectional Study. *Veterinary sciences*, 9(9), 482.

<https://doi.org/10.3390/vetsci9090482>

Pugliese, M., Sfacteria, A., Oliva, G., Falcone, A., Gizzarelli, M., & Passantino, A. (2021). Clinical Significance of ROMs, OXY, SHp and HMGB-1 in Canine Leishmaniosis. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(3), 754. <https://doi.org/10.3390/ani11030754>

Ready P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 15(10)

Rodrigues, A., Santos-Mateus, D., Alexandre-Pires, G., Valério-Bolas, A., Rafael-Fernandes, M., Pereira, M. A., Ligeiro, D., de Jesus, J., Alves-Azevedo, R., Lopes-Ventura, S., Santos, M., Tomás, A. M., Pereira da Fonseca, I., & Santos-Gomes, G. (2017). *Leishmania infantum* exerts immunomodulation in canine Kupffer cells reverted by meglumine antimoniate. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 55, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.09.004>

Santos, M. F., Alexandre-Pires, G., Pereira, M. A., Marques, C. S., Gomes, J., Correia, J., Duarte, A., Gomes, L., Rodrigues, A. V., Basso, A., Reisinho, A., Meireles, J., Santos-Mateus, D., Brito, M. T. V., Tavares, L., Santos-Gomes, G. M., & da Fonseca, I. P. (2019). Meglumine Antimoniate and Miltefosine Combined With Allopurinol Sustain Pro-inflammatory Immune Environments During Canine Leishmaniosis Treatment. *Frontiers in veterinary science*, 6, 362. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00362>

Sciorsci, R. L., Lillo, E., Occhiogrosso, L., & Rizzo, A. (2020). Ozone therapy in veterinary medicine: A review. *Research in veterinary science*, 130, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.03.026>

Sechi, S., Chiavolelli, F., Spissu, N., Di Cerbo, A., Canello, S., Guidetti, G., Fiore, F., & Cocco, R. (2015). An Antioxidant Dietary Supplement Improves Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Serum of Aged Dogs: Preliminary Results. *Journal of veterinary medicine*, 2015, 412501. <https://doi.org/10.1155/2015/412501>

- Sechi, S., Fiore, F., Chiavolelli, F., Dimauro, C., Nudda, A., & Cocco, R. (2017). Oxidative stress and food supplementation with antioxidants in therapy dogs. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 81(3), 206–216.
- Serafim, T. D., Iniguez, E., & Oliveira, F. (2020). Leishmania infantum. *Trends in parasitology*, 36(1), 80–81. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.006>
- Serra, M. E. G., Baeza-Noci, J., Mendes Abdala, C. V., Luvisotto, M. M., Bertol, C. D., & Anzolin, A. P. (2023). The role of ozone treatment as integrative medicine. An evidence and gap map. *Frontiers in public health*, 10, 1112296. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1112296>
- Smith, N. L., Wilson, A. L., Gandhi, J., Vatsia, S., & Khan, S. A. (2017). Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Medical gas research*, 7(3), 212–219. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.215752>
- Solano-Gallego, L., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Petersen, C., Bourdeau, P., Oliva, G., Miró, G., Ferrer, L., & Baneth, G. (2017). Diagnostic Challenges in the Era of Canine Leishmania infantum Vaccines. *Trends in parasitology*, 33(9), 706–717. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.06.004>
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., & The LeishVet Group (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors*, 4, 86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
- Sumida J. & Hayashi A. (2022) Ozone therapy in veterinary medicine: clinical indications and techniques. *Acta Veterinaria Brasilica* 16 (4) <https://doi.org/10.21708/avb.2022.16.4.10330>
- Toepp, A. J., & Petersen, C. A. (2020). The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Research in veterinary science*, 130, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.02.004>
- Torres, M.; Pastor, J.; Roura, X.; Tabar, M. D.; Espada, Y.; Font, A.; Balasch, J.; Planellas, M. . (2016). Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, 57(6), 299–304. <https://doi.org/10.1111/jsap.12484>
- Van Bockstal, L., Bulté, D., Hendrickx, S., Sadlova, J., Volf, P., Maes, L., & Caljon, G. (2020). Impact of clinically acquired miltefosine resistance by Leishmania infantum on mouse and sand fly infection. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 13, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.04.004>

Varol, K., Koç, A. N., Çakır Bayram, L., Arda, H., Keleş, İ., Ünlü, M., Güneş, V., Ekinci, G., Karaca Bekdik, İ., & Atalay, M. A. (2022). Studies on the Effectiveness of Ozone Therapy on the Treatment of Experimentally Induced Keratitis with *Candida albicans* in Rabbits. *Seminars in ophthalmology*, 37(2), 253–264.

<https://doi.org/10.1080/08820538.2021.1995006>

Viebahn-Haensler, R., & León Fernández, O. S. (2021). Ozone in Medicine. The Low-Dose Ozone Concept and Its Basic Biochemical Mechanisms of Action in Chronic Inflammatory Diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 7890.

<https://doi.org/10.3390/ijms22157890>

World Health Organization (2023, Janeiro, 12) *Leishmaniasis*. World Health Organization

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

World Organization for Animal Health (2021) *Leishmaniasis*. WOA *Terrestrial Manual*.

https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.11_LEISHMANIOSIS.pdf

Yasur-Landau, D., Jaffe, C. L., David, L., & Baneth, G. (2016). Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(1), e0004341. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004341>

Yasur-Landau, D., Jaffe, C. L., Doron-Faigenboim, A., David, L., & Baneth, G. (2017). Induction of allopurinol resistance in *Leishmania infantum* isolated from dogs. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(9), e0005910. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005910>

Apêndice A

Tabela A1- Tabela resumo dos valores de hemograma do grupo 1.

Animal	Hematócrito	Eritrócitos	Hemoglobina	VCM	CHCM	RDW	Plaquetas	Leucócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Monócitos	Basófilos
1	44,6	6,93	15,6	64,4	35	12,5	168	7,89	5,62	1,4	0,44	0,42	0,01
2	39,9	6,06	13,5	65,8	33,8	13,6	201	9,37	6,04	2,25	0,44	0,63	0,01
3	40,9	13,7	13,7	59,6	33,5	21,9	179	8,17	5,66	1	0,99	0,3	0,02
4	50,4	8	17,2	63	34,1	14,3	380	5,73	3,6	1,09	0,59	0,45	0
5	52,4	8,2	17,5	63,9	33,4	16,3	208	9,11	6,61	1,49	0,39	0,62	0
6	46,9	7,34	16	63,9	34,1	14,3	273	12,91	10,32	1,46	0,49	0,64	0
8	53,6	8,02	18,6	66,8	34,7	15,7	187	7,71	5,5	1,2	0,87	0,14	0
10	35,8	5,38	13,2	66,5	36,9	13,4	255	11,3	7,97	1,38	1,46	0,49	0,03
11	37,1	5,34	12,1	69,5	32,6	13,8	604	14,09	11,03	1,77	1,15	0,12	0,01

Tabela A2- Tabela resumo dos valores de hemograma do grupo 2.

Animal	Hematócrito	Eritrócitos	Hemoglobina	VCM	CHCM	RDW	Plaquetas	Leucócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Monócitos	Basófilos
1	41,8	6,47	14,8	64,6	35,4	12	93	8,58	6,14	1,54	0,36	0,53	0,01
2	40,1	5,96	14,1	67,3	35,2	12,1	252	8,81	4,76	3	0,53	0,51	0,01
3	39,4	6,05	14,1	65,1	35,8	13,6	263	8,81	4,96	2,2	1,3	0,34	0,01
4	45,7	7,38	16,3	61,9	35,7	16,3	345	6,9	4,81	1,14	0,61	0,34	0
5	54,1	8,56	19,1	63,2	35,3	17,1	214	8,66	5,8	1,76	0,4	0,7	0,01
6	44,8	7	15,5	64	34,6	13,5	257	8,89	7,13	1,21	0,16	0,38	0,01
8	50,8	7,59	18,1	66,9	35,6	13,2	347	7,35	5,44	0,92	0,13	0,85	0,01
10	36,4	5,51	12,7	66,1	34,9	12,5	264	9,37	6,65	0,92	0,48	1,31	0,01
11	42,3	6,38	15,2	66,3	35,9	15,9	351	9,94	6,13	3,04	0,1	0,66	0,01

Tabela A3- Tabela resumo dos valores de hemograma do grupo 3.

Animal	Hematócrito	Eritrócitos	Hemoglobina	VCM	CHCM	RDW	Plaquetas	Leucócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Monócitos	Basófilos
12	49,8	7,13	17,7	69,8	35,5	11,9	215	9,51	6,11	2,35	0,56	0,48	0,01
13	58,7	8,61	20,8	68,2	24,2	14,2	39	7,62	5,55	1,31	0,47	0,29	0
14	41,4	14,3	14,3	60	34,5	16,1	337	11,52	7,84	2,32	0,63	0,72	0,01
15	48,3	7,18	16,7	67,3	34,6	17,2	236	8,72	7,13	1,11	0	0,47	0,01

Tabela A4- Tabela resumo dos valores de bioquímicas do grupo 1.

Animal	PT	Globulinas	Crea	Ureia	Glucose	ALT	Albumina
1	6,91	4,06	0,86	26,6	92	30,8	2,9
2	6,14	3,76	1,23	78,1	105	27,9	2,4
3	9,44	6,53	0,74	19,8	104	131,6	2,91
4	6,87	3,84	0,95	19,2	81,3	52,7	3,03
5	6,28	2,99	1,67	19,8	92,2	39,6	3,29
6	7,17	4,38	0,91	14,4	83,3	51	2,79
8	6,97	3,84	0,52	25,8	74,5	62,4	3,13
10	6,31	2,77	0,71	5,3	103,6	199	3,54
11	7,23	4,53	0,73	28,6	82,7	57,5	2,7

Tabela A5- Tabela resumo dos valores de bioquímicas do grupo 2.

Animal	PT	Globulinas	Crea	Ureia	Glucose	ALT	Albumina
1	6,84	3,83	0,58	19,8	95,8	31,6	3,01
2	5,07	2,64	0,73	44,2	99,1	34,8	2,43
3	8,49	4,94	1,11	21,5	101,5	95,1	3,55
4	7,28	3,87	0,98	21,9	92,8	41,4	3,41
5	6,81	3,08	1,06	18,4	98,8	41,4	3,73
6	7,6	4,8	0,82	12,3	92,4	22	2,8
8	6,35	2,89	0,46	21,6	86,1	41,4	3,46
10	6,36	2,78	1,04	23,9	92,3	62,7	3,58
11	6,39	3,21	0,83	30,3	89,8	66,6	3,18

Tabela A6- Tabela resumo dos valores de bioquímicas do grupo 3.

Animal	PT	Globulinas	Crea	Ureia	Glucose	ALT	Albumina
12	6,57	3,31	1,04	8,3	134,6	212,8	3,26
13	6,29	2,71	0,93	16,9	95,9	37,3	3,58
14	6,14	2,72	0,79	12,5	101,1	34,5	3,42
15	6,21	3,09	0,51	15,4	82,7	124,7	3,12

Apêndice B

Tabela B1- Tabela de resultados do teste Anova unidirecional para o exame de hemograma, entre os três grupos de estudo. Considerado o valor de p com significância $p < 0,05$.

Parâmetro de Hemograma	ANOVA unidirecional
Hematócrito	0,3316
Eritrócitos	0,1869
Hemoglobina	0,2939
VCM	0,6556
CHCM	0,1092
RDW	0,1559
Plaquetas	0,6264
Leucócitos	0,5339
Neutrófilos	0,3499
Linfócitos	0,5593
Eosinófilos	0,1535
Monócitos	0,3887
Basófilos	0,9480

Tabela B2 - Tabela de resultados do teste Anova unidirecional para o exame de bioquímicas, entre os três grupos de estudo. Considerado o valor de p com significância $p < 0,05$.

Parâmetro Bioquímico	ANOVA unidirecional
PT	0,4111
Globulinas	0,1359
Creatinina	0,7647
Ureia	0,3538
Glicose	0,2339
ALT	0,2387
Albumina	0,1559

Tabela B3- Tabela de resultados do teste Anova unidirecional para o exame de *stress* oxidativo, entre os três grupos de estudo. Considerado o valor de p com significância $p < 0,05$.

Análise stress oxidativo	ANOVA unidirecional
d-ROMs	0,3261
PAT test	0,3262
OSI redox	0,2424

Apêndice C

Tabela C1- Tabela de resultados dos testes de stresse oxidativo dos animais do Grupo 1.

Animal	d-ROMs U CARR	PAT test U COR	OSI redox
1	35	3074	137
2	49	2488	129
3	155	3534	73
4	186	3658	59
5	104	2892	97
6	239	3160	24
7	96	2842	102
8	48	2349	131
9	98	3160	102

Tabela C2- Tabela de resultados dos testes de stresse oxidativo dos animais do Grupo 2.

Animal	d-ROMs	PAT test	OSI redox
1	82	2852	110
2	66	2542	119
3	97	3225	102
4	121	2749	88
5	99	2716	100
6	150	3007	71
7	115	2784	92
8	118	2749	90
9	99	2784	100

Tabela C3- Tabela de resultados dos testes de stresse oxidativo dos animais do Grupo 3.

Animal	d-ROMs	PAT test	OSI redox
1	108	1971	106
2	61	2646	122
3	16	2751	148
4	83	3352	111

Anexo A

Tabela A1 – Tabela de estadiamento de Leishmaniose Canina (Solano-Gallego et al., 2011).

Clinical stages	Serology *	Clinical signs	Laboratory findings	Therapy	Prognosis
Stage I Mild disease	Negative to low positive antibody levels	Dogs with mild clinical signs such as peripheral lymphadenomegaly, or papular dermatitis	Usually no clinicopathological abnormalities observed Normal renal profile: creatinine < 1.4 mg/dl; non-proteinuric: UPC < 0.5	Scientific neglect/allopurinol or meglumine antimoniate or miltefosine/allopurinol + meglumine antimoniate or allopurinol + miltefosine**	Good
Stage II Moderate disease	Low to high positive antibody levels	Dogs, which apart from the signs listed in stage I, may present: diffuse or symmetrical cutaneous lesions such as exfoliative dermatitis/onychogryphosis, ulcerations (planum nasale, footpads, bony prominences, mucocutaneous junctions), anorexia, weight loss, fever, and epistaxis	Clinicopathological abnormalities such as mild non-regenerative anemia, hyperglobulinemia, hypoalbuminemia, serum hyperviscosity syndrome Substages a) Normal renal profile: creatinine < 1.4 mg/dl; non-proteinuric: UPC < 0.5 b) Creatinine <1.4 mg/dl; UPC = 0.5-1	Allopurinol + meglumine antimoniate or allopurinol+ miltefosine	Good to guarded
Stage III Severe disease	Medium to high positive antibody levels	Dogs, which apart from the signs listed in stages I and II, may present signs originating from immune-complex lesions: vasculitis, arthritis, uveitis and glomerulonephritis.	Clinicopathological abnormalities listed in stage II Chronic kidney disease (CKD) IRIS stage I with UPC > 1 or stage II (creatinine 1.4-2 mg/dl) [79]	Allopurinol + meglumine antimoniate or allopurinol + miltefosine Follow IRIS guidelines for CKD [80]	Guarded to poor
Stage IV Very severe disease	Medium to high positive antibody levels	Dogs with clinical signs listed in stage III. Pulmonary thromboembolism, or nephrotic syndrome and end stage renal disease	Clinicopathological abnormalities listed in stage II CKD IRIS stage III (creatinine 2-5 mg/dl) and stage IV (creatinine > 5 mg/dl) [79] Nephrotic syndrome: marked proteinuria UPC > 5	Allopurinol (alone) Follow IRIS guidelines for CKD [80]	Poor

*Dogs with negative to medium positive antibody levels should be confirmed as infected by other diagnostic techniques such as cytology, histology, immunohistochemistry or PCR. High levels of antibodies, defined as a 3-4 fold elevation above the cut off level of a well established reference laboratory, are conclusive of a diagnosis of CanL. **Dogs in stage I (mild disease) are likely to require less prolonged treatment with one or two combined drugs or alternatively monitoring with no treatment. However, there is limited information on dogs in this stage and, therefore, treatment options remain to be defined.

Anexo B

d-ROMs fast test:

1. Once the centrifugation is completed, collect 10 μ L of R3 reagent (with white pipette) and pour it into the small cuvette containing the reagent liquid R2 of the d-ROMs test fast.
2. Collect 10 μ L of plasma (with white pipette) from the microvette with the provided pipette plus a new provided pipette-tip and pour it into the small cuvette containing the reagent liquid R2 of the d-ROMs test. Mix by inversion for about **15 seconds**. Please care to insert well the tip into the pipette.
3. Open the lid of the d-ROMs cuvette containing the condensed R1 reagent and **remove the security ring from the cuvette**. Pour the liquid of the R2 reagent, which you just prepared, into the cuvette containing the condensed R1 reagent. (The condensed reagent R1 sometimes appear as a very small drop at the bottom of the cuvette and sometimes it condenses in such small droplets which are not visible with naked eye and so the cuvette may appear empty, but it contains in any case the R1 reagent).
4. Close the lid of the cuvette and mix by inversion for at least 10 seconds. Please take care to mix by inversion for at least 10 seconds. Avoid foaming.
5. Insert the cuvette in the reading cell making sure that the ribbed sides are oriented according to the instructions reported and in accordance to the label over the reading cell of the instrument. Make sure also that the cuvette is pushed until the bottom of the reading cell. Wait for the result of the test.

PAT test:

1. Take the cuvette containing the reagent R1 of the PAT **remove the security ring from the cuvette** and add add 40 μ L of reagent R2 from the little bottle using the green light pipette. Close the cuvette with its lid and mix by inversion for 10 seconds.
2. Insert the cuvette into the reading cell (...as above....making sure that the ribbed sides are oriented according to the instructions reported and in accordance to the label over the reading cell of the instrument. Make sure also that the cuvette is pushed till the bottom of the reading cell). Wait for the first reading.
3. Remove the cuvette from the reading cell.
4. Collect 10 μ L of plasma (with white pipette) from the microvette with the provided pipette plus a new provided pipette-tip and pour it into the small cuvette containing the liquid R1 + R2 of the PAT test, which you just removed from the reading cell. Please care to insert well the tip into the pipette.
5. Close the cuvette with its lid and mix by inversion for about **10 seconds**.
6. Insert the cuvette into the reading cell (...as above....making sure that the ribbed sides are oriented according to the instructions reported and in accordance to the label over the reading cell of the instrument. Make sure also that the cuvette is pushed until the bottom of the reading cell). Wait for the result of the test.

Figura B1 - Protocolo de medição de d-ROMs e teste PAT fornecido por H&L srl.