

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

# **Leishmaniose Canina**

## **Estudo de casos clínicos**

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

André Miguel Mateus Vieira

Orientador: Professor Doutor Luís Cardoso



Vila Real, 2013

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

# **Leishmaniose Canina**

## **Estudo de casos clínicos**

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

André Miguel Mateus Vieira

Orientador: Professor Doutor Luís Cardoso



Vila Real, 2013

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Luís Cardoso por ter aceitado ser meu orientador, pelos comentários, gentileza, dedicação e disponibilidade demonstrada ao longo de toda a realização deste trabalho.

À toda equipa do Hospital Veterinário do Baixo Vouga pelos 5 meses de estágio, durante os quais aprendi não só em termos profissionais, mas também em relações, quer interpessoais quer em interajuda. Ensinarão-me que não basta só o conhecimento pessoal, que o intercâmbio de ideias, esforços e pensamentos permitem chegar a uma meta, a saúde (ou dentro de possível) dos nossos animais.

À toda equipa do Hospital Veterinário de Trás-os-Montes, pelos ensinamentos transmitidos, amizade, ajuda e boa disposição ao longo do período de estágio.

Aos meus tios-avós, Domingos, Nisete e Virgínia, por tomarem conta de mim, desde os 9 anos, quando mais ninguém o quis. Por me terem proporcionado a melhor formação académica, pela educação, condições e pelo sentido de trabalho e responsabilidade.

Aos meus padrinhos, Goreti e Manuel, por estarem sempre presentes, nos bons e maus momentos, pela ajuda, amizade e conselhos.

Aos meus primos, Pedro e Miguel, pelo amor e carinho.

À Sara por significar muito para mim. Pelo carinho, amizade, confiança e ensinamentos transmitidos. Pela paciência e disponibilidade para ouvir os meus desabafos, pela força e coragem, e por me fazer acreditar num futuro melhor e promissor.

Aos meus grandes amigos, Filhipa, Diana, Luiza, Inês, Sofia, Bé, Xica, Bruno e Adrià, por me terem vindo acompanhando nesta grande aventura que durou 6 anos. Obrigado por estarem presentes nos melhores momentos e nos menos fáceis, e serem tão importantes na minha vida. Pela cumplicidade, amor e companheirismo que temos entre nós, que mesmo a distância não consegue desvanecer.

## Resumo

A LCan é uma doença endémica e bastante frequente em Portugal. Esta zoonose é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, sendo os cães os principais hospedeiros reservatórios da infeção para os seres humanos. A forma infetante do parasita é a promastigota desenvolvida no trato gastrointestinal de pequenos insetos do género *Phlebotomus*, no Velho Mundo, vetores biológicos que transmitem o agente entre hospedeiros mamíferos. Sendo a leishmaniose uma doença sistémica de curso crónico, apresentando um quadro clínico diversificado, o diagnóstico deve ser efetuado o mais precocemente possível e a terapêutica rigorosamente cumprida. Para além disso, é indispensável monitorização laboratorial a intervalos regulares. A implementação de uma profilaxia e controlo eficaz assumem um papel necessário no cão.

Durante o período de estágio (Setembro de 2012 a Abril de 2013), no Hospital Veterinário do Baixo Vouga e no Hospital Veterinário de Trás-os-Montes, foram acompanhados diversos casos clínicos de LCan. A seleção dos quatro animais incluídos nesta dissertação teve como intuito eleger casos que apresentassem uma ampla diversidade de sinais clínicos. O diagnóstico foi realizado através da deteção das formas amastigotas de *Leishmania* em citologias aspirativas por agulha fina de medula óssea e através da quantificação do título de anticorpos anti-*Leishmania*. Os protocolos terapêuticos instituídos foram: alopurinol de forma isolada, combinações de alopurinol com antimoniato de meglumina e combinação de alopurinol com miltefosina. Foram necessárias monitorizações regulares, uma vez que pode ocorrer recorrência das manifestações clínicas.

A LCan é uma doença cada vez mais frequente, como se comprovou pelo número de casos observados durante o período de estágio curricular. Assim sendo, cabe ao médico veterinário incutir e aconselhar aos proprietários a utilização de terapia combinada com inseticidas e/ou repelentes, vacinação e domperidona (Leisguard®), para diminuir o risco de infeção e transmissão.

## Abstract

CanL is an endemic and very common disease in Portugal. This zoonosis is caused by *Leishmania infantum* and dogs are the main infection reservoirs regarding humans. The parasite's infective form is the promastigote that is developed in the gastrointestinal tract of small insects of the genus *Phlebotomus*, in the Old World. This promastigote is the biological vector that transmits the agent between mammalian hosts. Leishmaniasis is a chronic course systemic disease, that presents a diverse clinical picture, and whose diagnosis should be made as early as possible and the treatment should be strictly enforced. Furthermore, laboratory monitoring at regular intervals is essential. The implementation of an effective prophylaxis and control also play a necessary and important role in the dog.

During the internship period (September 2012 to April 2013), spent in Hospital Veterinário do Baixo Vouga and Hospital Veterinário de Trás-os-Montes, several clinical cases of CanL were followed. The four animals selected in this dissertation presented a wide variety of clinical signs. The diagnosis was made by detection of *Leishmania* amastigotes through fine-needle aspiration cytology of bone marrow and by quantifying the *Leishmania*-specific antibodies titer. The therapeutic protocols used were: isolated allopurinol, combinations of allopurinol and meglumine antimoniate and allopurinol and miltefosine. This procedure took regular monitoring, since recurrent clinical manifestations could occur.

CanL is an increasing disease, as evidenced by the number of clinical cases observed during the internship. Therefore, it is up to the veterinarian to instill and advice the owners on the use of a combination therapy with insecticides and/or repellents, vaccination and domperidone (Leisguard®), in order to reduce the risk of infection and transmission.

## Índice geral

INTRODUÇÃO.....	1
1. REVISÃO DA LITERATURA CIENTÍFICA.....	4
1.1. Etiologia.....	4
1.2. Epidemiologia.....	5
1.3. Ciclo biológico.....	7
1.4. Patogenia.....	10
1.5. Sinais clínicos.....	13
1.5.1. Alterações cutâneas.....	13
1.5.2. Linfadenomegalia e esplenomegalia.....	14
1.5.3. Alterações renais.....	15
1.5.4. Atrofia muscular.....	16
1.5.5. Distúrbios hemorrágicos.....	17
1.5.6. Alterações locomotoras.....	18
1.5.7. Lesões oculares.....	18
1.5.8. Sinais clínicos menos comuns.....	19
1.6. Diagnóstico.....	19
1.6.1. Análises laboratoriais não específicas.....	20
1.6.2. Avaliação citológica.....	21
1.6.3. Avaliação histopatológica.....	22
1.6.4. Cultura.....	22
1.6.5. Métodos serológicos.....	23
1.6.6. Métodos moleculares.....	24
1.7. Tratamento.....	26
1.7.1. Antimoniais pentavalentes.....	27
1.7.2. Alopurinol.....	28
1.7.3. Miltefosina.....	29
1.7.4. Combinação de antimoniato de meglumina e alopurinol.....	29
1.7.5. Combinação de miltefosina e alopurinol.....	29
1.7.6. Anfotericina B.....	30
1.7.7. Outras associações medicamentosas.....	30
1.7.8. Monitorização.....	30

1.8. Controlo e profilaxia.....	31
1.9. Prognóstico.....	34
2. CASOS CLÍNICOS.....	35
2.1. Caso clínico nº 1 (Scott).....	36
2.2. Caso clínico nº 2 (Messi).....	43
2.3. Caso clínico nº 3 (Plutão).....	50
2.4. Caso clínico nº 4 (Panzer).....	58
3. DISCUSSÃO.....	67
4. CONCLUSÕES.....	74
5. BIBLIOGRAFIA.....	76

## Índice de figuras e tabelas

Figura 1. Formas amastigotas da espécie <i>Leishmania</i> no interior de macrófago.....	5
Figura 2. Forma promastigota da espécie <i>Leishmania</i> numa cultura.....	5
Figura 3. Distribuição geográfica das espécies de <i>Leishmania</i> que infetam o cão e os seus respetivos vetores.....	6
Figura 4. Espécie <i>Phlebotomus perniciosus</i> .....	7
Figura 5. Alimentação de um flebótomo num animal infetado.....	8
Figura 6. Ciclo de vida de <i>L. infantum</i> com indicação das prováveis e menos prováveis vias de transmissão para os cães.....	9
Figura 7. Interação entre as respostas imunitárias Th1 e Th2 na LCan.....	12
Figura 8. Dermatite exfoliativa não pruriginosa num cão diagnosticado com leishmaniose.....	14
Figura 9. Cão com caquexia, atrofia muscular e descamação excessiva.....	16
Figura 10. Epistaxis num cão diagnosticado com leishmaniose.....	17
Figura 11. Uveíte num cão diagnosticado com leishmaniose.....	18
Figura 12. QCS num cão diagnosticado com leishmaniose.....	19
Figura 13. Citologia de medula óssea. Presença de formas amastigotas de forma livre e no interior do macrófago.....	21
Figura 14. Radiografia do joelho esquerdo em extensão.....	39
Figura 15. Radiografia do joelho esquerdo em flexão.....	39
Figura 16. Messi aquando a primeira consulta.....	43
Figura 17. Pelagem sem brilho. Hipotricose difusa em torno dos olhos.....	44
Figura 18. Hipotricose localizada no membro anterior direito. Onicogribose.....	44
Figura 19. Citologia de medula óssea.....	48
Figura 20. Plutão aquando a primeira consulta.....	50
Figura 21. Olho direito com exoftalmia ligeira (característica da raça); corrimento ocular mucopurulento; hiperemia conjuntival ligeira e hiperpigmentação da córnea....	51
Figura 22. Olho esquerdo com exoftalmia ligeira (característica da raça); corrimento ocular mucopurulento; hiperemia conjuntival ligeira e hiperpigmentação da córnea....	51
Figura 23. Citologia de medula óssea.....	56
Figura 24. Panzer aquando a primeira consulta.....	58
Figura 25. Citologia de medula óssea.....	62

Tabela 1. Estadiamento clínico da leishmaniose canina com base na sorologia específica, sinais clínicos, dados laboratoriais, tipo de terapia e prognóstico para cada fase.....	27
Tabela 2. Casuística dos casos observados durante o período de estágio.....	35
Tabela 3. Hemograma do Scott.....	37
Tabela 4. Bioquímica sérica do Scott.....	38
Tabela 5. Análise de urina do Scott.....	39
Tabela 6. Resultado LeisScan®, teste de ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> .....	40
Tabela 7. Análise das proteínas e creatinina urinárias, e rácio UP/C.....	41
Tabela 8. Análise de urina do Scott.....	41
Tabela 9. Exame dermatológico do Messi.....	44
Tabela 10. Tricograma.....	45
Tabela 11. Raspagem.....	45
Tabela 12. Hemograma do Messi.....	46
Tabela 13. Bioquímica sérica do Messi.....	47
Tabela 14. Análise de urina do Messi.....	47
Tabela 15. Resultado da sorologia (IFAT).....	48
Tabela 16. Proteinograma do Messi.....	49
Tabela 17. Exame oftalmológico do Plutão.....	50
Tabela 18. Hemograma do Plutão.....	53
Tabela 19. Bioquímica sérica do Plutão.....	55
Tabela 20. Resultado da sorologia (IFAT).....	55
Tabela 21. Proteinograma do Plutão.....	55
Tabela 22. Hemograma do Panzer.....	59
Tabela 23. Bioquímica sérica do Panzer.....	60
Tabela 24. Análise de urina do Panzer.....	61
Tabela 25. Proteinograma do Panzer.....	62
Tabela 26. Resultados da medição das pressões arteriais.....	63

## **Lista de abreviaturas, siglas, símbolos ou acrónimos**

% – percentagem

® – símbolo de marca registada

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AINE – anti-inflamatório não esteróide

ALP – fosfatase alcalina

ALT – alanine amino-transferase

ARN – Ácido ribonucleico

AST – aspartato transaminase

BUN – ureia nitrogenada sérica

BID – administração de 12 em 12 horas

CBC – complete blood count

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

CIC – imunocomplexos circulantes

DAT – teste de aglutinação direta

ELISA – teste imunoenzimático

GGT – gama glutamil transferase

Hct – hematócrito

HVBV – Hospital Veterinário do Baixo Vouga

HVTM – Hospital Veterinário de Trás-os-Montes

IFAT – teste de imunofluorescência indireta

IFN – interferão

Ig – imunoglobulinas

IL – interleucina

IM – via intra-muscular

IRIS – International Renal Interest Society

IRC – insuficiência renal crónica

ITS – internal transcriber spacer

IV – via intravenosa

LCan – leishmaniose canina

LC – leishmaniose cutânea

LV – leishmaniose visceral

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial de hidrogénio

PO – *per os*

Pu/pd – poliúria/polidipsia

QA – *Quillaja saponária*

QCS – queratoconjuntivite seca

QID – administração de 6 em 6 horas

SID – administração de 24 em 24 horas

SC – via subcutânea

Th – T auxiliares

TID – administração de 8 em 8 horas

TNF – fator de necrose dos tumores

UP/C – rácio proteína creatinina urinário

VCM – volume corpuscular médio

VPM – volume plaquetário médio

WB – imunodeteção

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose pertence a um grupo de doenças zoonóticas que afetam seres humanos, animais domésticos e selvagens, sendo causadas por membros do género *Leishmania* (Baneth e Solano-Gallego, 2012). A leishmaniose canina (LCan) é potencialmente fatal para os cães que constituem o principal reservatório de infeção para os humanos (Gramiccia e Gradoni, 2005).

A LCan é endémica em mais de 70 países, estando presente em certas regiões do Sul da Europa, África, Ásia, América do Sul e Central (Baneth *et al.*, 2008), tendo sido relatada, também, nos Estados Unidos da América (Petersen e Barr, 2009).

Foi estimado que pelo menos 2,5 milhões de cães se encontram infetados só no sudoeste da Europa (Moreno e Alvar, 2002) e que a doença está a espalhar-se para norte atingindo o sopé dos Alpes e Pirinéus (Ferroglio *et al.*, 2005). Também na América do Sul se verifica uma elevada prevalência de infeção, rondando os milhões, sobretudo em algumas áreas da Venezuela e Brasil, aumentando o risco, assim, de transmissão aos humanos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A LCan é encontrada, muitas vezes, em países não endémicos devido aos turistas ou emigrantes que transportam consigo os cães infetados ou devido à importação canina. Como hospedeiros reservatórios, os cães podem infetar os flebótomos aquando da sua alimentação, mantendo-se portadores subclínicos por períodos prolongados (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

A infeção ocorre por intermédio de insetos do género *Phlebotomus* no Velho Mundo e do género *Lutzomyia* no Novo Mundo. Os hospedeiros reservatórios variam conforme as diferentes áreas geográficas, podendo incluir animais domésticos e selvagens. A leishmaniose causada pela espécie *Leishmania infantum* (sinónimo: *Leishmania chagasi* no Novo Mundo) é causa de doença clínica em seres humanos e cães (Baneth e Solano-Gallego, 2012). As características clínicas da doença variam amplamente, podendo no Homem ser dividido em forma visceral, cutânea e mucocutânea. Nos cães, as características clínicas são semelhantes à forma visceral humana em conjunto com complicações cutâneas graves (Gramiccia, 2011).

Esta doença dos cães é manifestada por um vasto espectro de sinais clínicos e graus de gravidade, não existindo, contudo, consenso científico suficiente no que diz respeito à gestão desta patologia (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

O diagnóstico baseia-se, primariamente, na história pregressa e presença de sinais clínicos compatíveis com leishmaniose, passando, posteriormente, para a análise citológica

dos tecidos afetados e análises serológicas específicas. Testes mais precisos e específicos poderão ser realizados, dependendo dos resultados anteriores (Paltrinieri *et al.*, 2010).

O tratamento de LCan constitui um verdadeiro desafio para os médicos veterinários pois a progressão e curso da doença são, completamente, imprevisíveis. Apesar dos fármacos protocolos e combinações existentes destinados à resolução desta enfermidade apenas serem capazes de efetuar remissão da sintomatologia, podendo sempre ocorrerem recorrências, duvida-se que possuam capacidade de eliminar a infeção (Oliva *et al.*, 2010). Em termos de profilaxia, existe um conjunto de formas que permitem a prevenção, como inseticidas tópicos e vacinas (Miró *et al.*, 2008).

A LCan é complexa, apresentando uma elevada prevalência de infeção, rondando 63-80% da população, acompanhada, também, por um baixo grau de doença clínica aparente. (Baneth *et al.*, 2008). É uma parasitose com dupla repercussão: por um lado em saúde pública, dado ao seu carácter zoonótico e ao papel do cão como reservatório, por outro em medicina veterinária, pela sua ocorrência frequente, dificuldade no diagnóstico precoce e relativa falta de eficácia da terapêutica, constituindo uma doença altamente problemática (Martínez-Moreno *et al.*, 1999).

Esta dissertação foi baseada em dois estágios curriculares: o primeiro realizado no Hospital Veterinário do Baixo Vouga (HVBV), em Águeda, Aveiro, entre 3 de Setembro de 2012 a 31 de Janeiro de 2013, e o segundo realizado no Hospital Veterinário de Trás-os-Montes (HVTM), em Vila Real, entre 4 de Fevereiro a 30 de Abril de 2013. O HVBV foi inaugurado no dia 1 de Março de 2008, resultando de um projeto que teve início no ano 2000 com a abertura da Clínica Veterinária da Mourisca. É composto por uma equipa multidisciplinar de profissionais de saúde dedicados e prontos a responder a qualquer solicitação por parte dos seus clientes, a qualquer hora, 365 dias por ano. Para tal, o HVBV dispõe de um serviço de urgência com médico veterinário e enfermeiro veterinário permanentes. Para além disso, no sentido de responder à maior procura de serviços especializados e à necessidade de constante evolução científica dos seus profissionais, o HVBV contempla um centro de formação desenvolvido em parceria com a Improve Ibérica, permitindo que todos os seus profissionais se mantenham em atualização constante e em contacto permanente com os melhores especialistas do mundo. O HVTM foi fundado em 2002, sendo criado com o intuito de diversificar a assistência médico-veterinária, não só em Vila Real, mas também em toda a região de Trás-os-Montes. Funciona 24 horas por dia, 365 dias por ano, com clínicos residentes prontos para receber qualquer urgência a qualquer hora,

em qualquer especialidade. Este hospital reúne todas as condições para o tratamento dos animais de companhia, apresentando dois consultórios, sala de preparação e pré-cirurgia, sala de radiologia, laboratório, sala de ecografia/ecocardiografia e eletrocardiografia, internamento geral, internamento de doenças infeto-contagiosas separado e um espaço ao ar livre onde os animais podem passear. Durante os 8 meses de estágio pude acompanhar casos clínicos e cirúrgicos de todas as áreas de especialidade de animais de companhia, e a dura realidade da prática clínica.

No que se refere ao tema da dissertação, a escolha do tema “leishmaniose canina” deve-se ao facto de esta patologia ser uma das principais doenças do canídeo, sendo de grande importância em Medicina Veterinária e saúde pública, uma vez que é uma zoonose preocupante para o homem, e por apresentar uma panóplia de manifestações clínicas, constituindo um verdadeiro desafio para o médico veterinário.

O objetivo principal deste trabalho foi o de desenvolver e consolidar conhecimentos sobre a LCan, através do acompanhamento de casos clínicos. Para tal, foram estabelecidos objetivos mais específicos: acompanhar todos os procedimentos clínicos e meios de diagnóstico, do tratamento e da evolução clínica dos casos observados; e a interpretação de todos os dados clínicos, para cada caso individualmente, e a sua comparação com a informação disponível na bibliografia. Todas as decisões clínicas foram tomadas pelos médicos veterinários responsáveis por cada caso.

Na primeira parte deste trabalho é apresentada uma revisão bibliográfica do tema, desde a etiologia, até aos meios de diagnóstico, tratamento e profilaxia. Na segunda parte do trabalho apresentam-se quatro casos clínicos de leishmaniose, do Scott, do Messi, do Plutão e do Panzer, todos eles apresentando quadros clínicos distintos.

Através desta dissertação tenciona-se compreender melhor o relevo e o impacto que a leishmaniose tem na vida dos cães, e a importância do tratamento e do uso da terapia combinada com outras medidas de controlo e profilaxia.

# 1. REVISÃO DA LITERATURA CIENTÍFICA

## 1.1. Etiologia

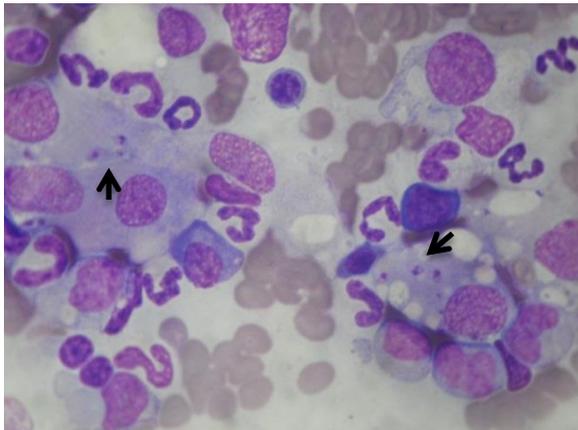
Os parasitas *Leishmania* spp. são protozoários difásicos cujo o género está dividido em dois subgéneros *Leishmania* e *Viannia*, baseado nas diferenças da localização do desenvolvimento do parasita dentro do flebótomo (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Enquadram-se no filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae (Martínez-Moreno *et al.*, 1999). Caracterizam-se por uma estrutura contendo ADN mitocondrial, cinetoplasto, que se encontra ligado ao corpo basal, dando origem a um flagelo (Ciaramella e Corona, 2003). A diferenciação no subgénero *Leishmania* é baseada, principalmente, na comparação das sequências de ADN, nos padrões de migração das isoenzimas (zimodemes) por electroforese, na reatividade aos anticorpos monoclonais e antigénios na membrana celular (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

As leishmânias são caracterizadas, em geral, por dois diferentes tipos morfológicos principais: amastigota e promastigotas. (Ciaramella e Corona, 2003; Soi *et al.*, 2010). As formas amastigotas (Figura 1) são estruturas ovóides ou redondas, de 2.5-5 µm de comprimento e 1.5-2 µm de largura, possuem um núcleo excêntrico basófilo, o cinetoplasto mais escuro, com forma de haste, pode ser visível através de uma coloração Giemsa ou Wright, são encontradas no interior das células do hospedeiro vertebrado, multiplicando-se por divisão binária, e, conseqüentemente, provocam a rutura das mesmas, infectando novas células (Baneth e Solano-Gallego, 2012). As formas promastigotas (Figura 2) são estruturas móveis, com corpo de 10-15 µm, possuem um longo flagelo alongado (até 20 µm) e são tipicamente encontradas no hospedeiro invertebrado (Martínez-Moreno *et al.*, 1999; Ciaramella e Corona, 2003).

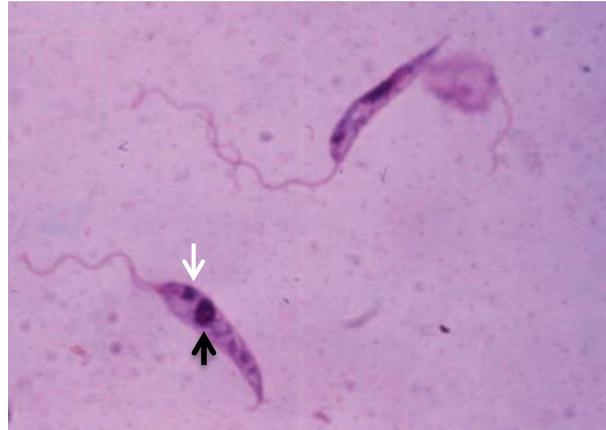
Existe um vasto leque de espécies de *Leishmania*, cobrindo uma ampla distribuição geográfica, causadoras de doença quer em seres humanos quer em cães, sendo as espécies infetantes nestes últimos as seguintes: *L. infantum* (*L. chagasi*), *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania peruviana* e *Leishmania panamensis*. Dentro destas a espécie mais importante é *L. infantum*, que contribui para um maior risco nos animais de companhia, uma vez que o cão é o principal hospedeiro reservatório de infeção no homem.

Os cães podem, esporadicamente, ser infetados por outras espécies de *Leishmania* responsáveis por leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea em seres humanos. Contudo, para estas espécies, os cães não aparentam contribuir como um significativo reservatório de infecção para os seres humanos (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Em 16 países da bacia mediterrânea foram identificados 12 zimodemes da espécie *L. infantum*: MON-1, MON-24, MON-34, MON-72, MON-77, MON-80, MON-98, MON-105, MON-108, MON-199, MON-199 var NP1130 e MON-281. Destes, o predominante é o zimodeme MON-1, fazendo do cão o seu principal reservatório (Ait-Oudhia *et al.*, 2011).



**Figura 1** - Formas amastigotas da espécie *Leishmania* no interior de macrófagos, setas (fotografia de André Vieira).



**Figura 2** - Forma promastigota da espécie *Leishmania* numa cultura; seta branca cinetoplasto, seta preta núcleo (adaptado de Baneth e Solano-Gallego, 2012).

## 1.2. Epidemiologia

Cerca de 30 espécies diferentes de *Leishmania* são encontradas em várias regiões do Velho Mundo e do Novo Mundo, sendo que aproximadamente 20 são responsáveis por um amplo espectro de doenças em humanos. A maioria são zoonóticas e apenas algumas são antroponóticas (Baneth e Solano-Gallego, 2012). As doenças provocadas por estes parasitas em humanos são divididas em três formas de acordo com as suas manifestações clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea, e leishmaniose visceral (LV) (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A LC é endêmica em mais de 70 países, estando presente em certas regiões do Sul da Europa, África, Ásia, América do Sul e Central (Baneth *et al.*, 2008), e tendo sido relatada, também, nos Estados Unidos da América (Petersen e Barr, 2009). A doença é encontrada, muitas vezes, em países não endêmicos devido aos turistas ou emigrantes que transportam consigo cães infetados ou devido à importação destes animais (Baneth e Solano-Gallego,

2012). Foram descritas, também, infecções em gatos, canídeos selvagens e cavalos nas áreas geográficas onde a doença é endêmica (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011).

Os únicos vetores biológicos aceites na transmissão das espécies de *Leishmania* são os flebótomos (Dantas-Torres, 2011), sendo que na LCan estão envolvidos apenas dois géneros: *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Paltrinieri *et al.*, 2010). Na Europa, mais precisamente na região mediterrânica, os principais vetores de *L. infantum*, causadora da LV e da LC, bem como da LCan, pertencem ao subgénero *Larroussius* (Bongiorno *et al.*, 2003). *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus perfiliewi*, *Phlebotomus neglectus* e *Phlebotomus tobbi* são os cinco principais vetores pertencentes a este subgénero (Paltrinieri *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011).

As espécies de *Leishmania* que infetam o cão, os seus vetores e a sua distribuição geográfica são apresentadas na Figura 3.

<i>Leishmania</i> species	Geographical distribution	Proven sand fly vectors	Suspected sand fly vectors
<i>L. infantum</i>	Mediterranean basin Middle East	<i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> , <i>P. perfiliewi</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. langeroni</i> , <i>P. tobbi</i>	<i>P. longicuspis</i> , <i>P. syriacus</i> , etc.
	Southern Asia, Iran, Armenia, Afghanistan	<i>P. kandelakii</i>	<i>P. brevis</i> , <i>P. halepensis</i> , etc.
	Central Asia, China	<i>P. chinensis</i> , <i>P. alexandri</i>	<i>P. smirnovi</i> , <i>P. transcaucasicus</i> <i>P. longiductus</i>
<i>L. infantum</i> = <i>L. chagasi</i>	Central and South America	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lu. evansi</i> , <i>Lu. olmeca olmeca</i>	<i>Lu. antunesi</i> , <i>Lu. shannoni</i>
<i>L. donovani</i>	East Africa	<i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i>	<i>P. rodhaini</i>
<i>L. tropica</i>	North Africa	<i>P. sergenti</i> , <i>P. arabicus</i>	<i>P. chabaudi</i> , <i>P. saevus</i>
<i>L. braziliensis</i>	Central to South America	<i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. spenicrassa</i> , <i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. yucumensis</i> , <i>Lu. carrerai carrerai</i> , <i>Lu. llanosmartinsi</i> , <i>Lu. ovallesi</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , <i>Lu. umbratilis</i>	<i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. migonei</i> , <i>Lu. panamensis</i> , <i>Lu. paraensis</i> , <i>Lu. complexus</i> , <i>Lu. pessoai</i> , etc.
<i>L. peruviana</i>	Peruvian Andes	<i>Lu. peruensis</i> , <i>Lu. verrucarum</i> , <i>Lu. ayacuchensis</i>	<i>Lu. noguchii</i> , <i>Lu. pescei</i>
<i>L. panamensis</i>	Central America	<i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. panamensis</i> , <i>Lu. hartmanni</i>	<i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. ovallesi</i> , etc.

**Figura 3** – Distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* que infetam o cão e os seus respetivos vetores (adaptado de Solano-Gallego, *et al.*, 2009).

Na LCan, infeção não é obrigatoriamente o mesmo que doença, pois há uma elevada prevalência de infeção subclínica, não apresentando os animais qualquer sinal clínico ou alteração clinicopatológica. A doença pode manifestar-se subclínicamente ou como formas auto-limitantes, ou então como patologia grave e/ou fatal, podendo registar-se uma ampla gama de fenómenos imunológicos e clínicos (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Vários fatores, como a idade, a raça e a constituição genética, foram associados ao desenvolvimento de LCan. A idade parece ser um fator importante. Relatos apontam que a distribuição da infeção é bimodal, com maior prevalência em cães jovens, abaixo dos 3 anos, e com idade superior a 8 anos. Certas raças, como o Boxer, o Cocker Spaniel, o Rottweiler e o Pastor Alemão parecem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença, enquanto o

Podengo de Ibiza raramente desenvolve sinais clínicos de leishmaniose. Em termos genéticos, o gene canino *Slc11c1* e certos alelos do MHC II foram associados à suscetibilidade ao desenvolvimento de LCan (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Para além destes, fatores como o estado nutricional, infecções e doenças concomitantes, virulência do parasita e exposição prévia ao mesmo parecem influenciar a suscetibilidade à doença (Baneth *et al.*, 2008).

### 1.3. Ciclo biológico

O ciclo de vida natural de *Leishmania* envolve hospedeiro intermediário flebotomíneo e um hospedeiro definitivo vertebrado (Baneth e Solano-Gallego, 2012). O vetor classifica-se, taxonomicamente, na ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, estando presente onde o parasita é endêmico (Maroli *et al.*, 2013).

Os flebótomos (Figura 4) são pequenos insetos de 2-3,5 mm de comprimento (Ciaramella e Corona, 2003). São cobertos por uma camada densa de pêlos, mantendo as suas asas em forma de V, característico, aquando do repouso, possuem pernas longas e delicadas, e a sua cor pode ir desde branco a preto (Maroli *et al.*, 2013).



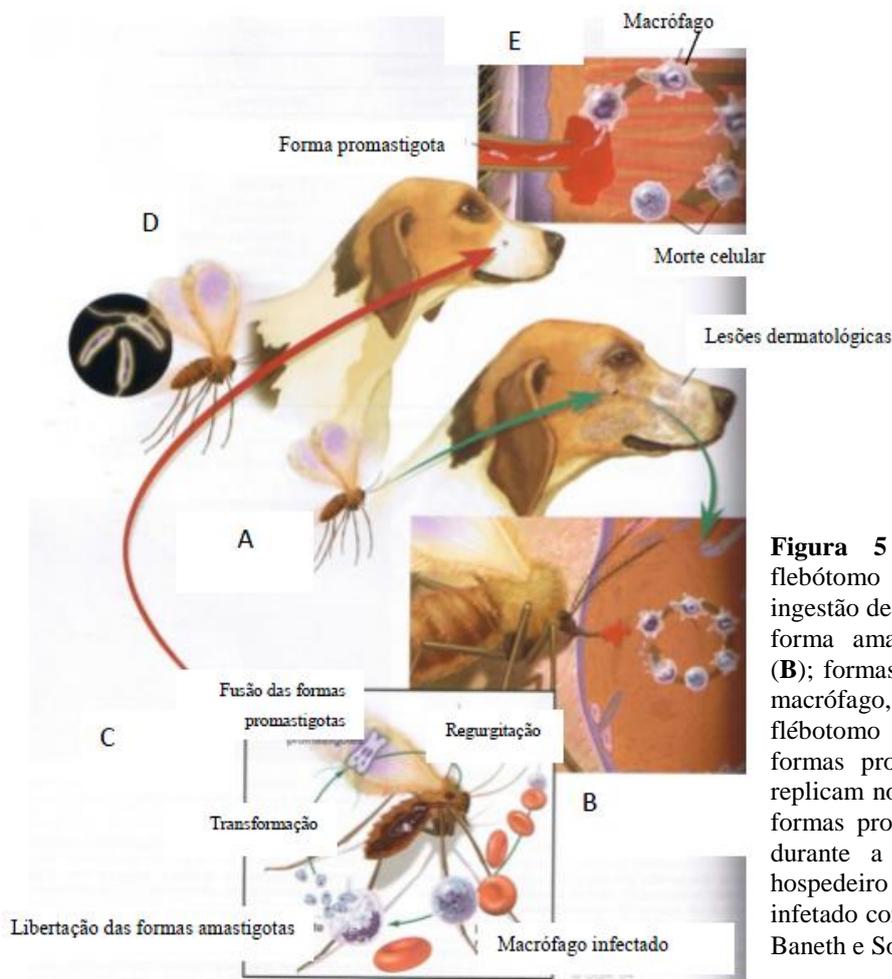
**Figura 4** – Espécie *Phlebotomus perniciosus* (adaptado de González, 2006)

Na bacia do Mediterrâneo e Ásia os flebótomos encontram-se mais ativos nos meses quentes, ou seja, desde a Primavera até ao final do Outono. Na América Latina, algumas espécies encontram-se ativas durante todo o ano (Baneth e Solano-Gallego, 2012). A atividade dos flebótomos verifica-se durante a noite, sendo o seu pico entre as 3h30-5h30 (Ciaramella e Corona, 2003; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Machos e fêmeas alimentam-se de secreções açucaradas de variadas plantas, sendo que as fêmeas necessitam de, pelo menos, uma refeição de sangue para, assim, completarem o desenvolvimento dos ovos. São incapazes de voar a grandes velocidades, fator limitante na sua dispersão, sendo o seu alcance de voo muito curto (cerca de 300 m), o que faz com que as suas atividades sejam restritas, não se dispersando mais que 1 km do local de criação (González, 2006; Baneth e Solano-Gallego, 2012; Maroli *et al.*, 2013).

O ciclo biológico de *Leishmania* no flebotomo fêmea inicia-se quando este ingere as formas amastigotas ao alimentar-se de sangue de hospedeiros infetados (Baneth e Solano-Gallego, 2012), preferencialmente de zonas de pêlo rarefeito, como cabeça, focinho, pavilhões auriculares, áreas inguinais e perineais (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A duração do ciclo no hospedeiro intermediário invertebrado pode variar desde 4 dias até ao máximo de 20 dias, tudo dependente das condições climáticas externas (Ciaramella e Corona, 2003).

Os parasitas são inoculados com a saliva na pele do hospedeiro definitivo, quando o flebotomo se alimenta novamente, sendo fagocitados por macrófagos cutâneos. Aí perdem o flagelo, transformando-se, novamente, em formas amastigotas (Figura 5 e 6) (Ciaramella e Corona, 2003; Baneth e Solano-Gallego, 2012).



**Figura 5** – Alimentação de um flebotomo num animal infetado (A); ingestão de macrófagos infetados com a forma amastigota existentes na pele (B); formas amastigotas libertam-se do macrófago, no interior do intestino do flebotomo (C) e transformam-se em formas promastigotas móveis que se replicam no intestino do inseto (D). As formas promastigotas são regurgitadas durante a alimentação do vetor ao hospedeiro definitivo, tornando-o assim infetado com o agente (E) (adaptado de Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Foram descritos outros meios de transmissão para além dos vetores, como a infeção através de transfusão sanguínea a partir de dadores infetados, a transmissão venérea e a transmissão vertical (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Machos infetados podem, muitas vezes, desenvolver lesões genitais, mais precisamente no epidídimo, prepúcio e glândulas anexas,

apresentando *Leishmania* no sêmen. Um estudo na Alemanha relata transmissão venérea de leishmaniose em cães Pastor Alemão, de machos naturalmente infetados para fêmeas suscetíveis (Naucke e Lorentz, 2012). Noutro estudo, na América do Norte, foi detetado ADN de *Leishmania*, através de PCR, em alguns tecidos de 3 crias fruto do cruzamento entre uma cadela experimentalmente infetada e um macho naturalmente infetado. O ADN leishmânico foi encontrado no tecido hepático e cardíaco em duas das três crias, e no tecido esplênico, linfonodos, rim e placenta em todas (Rosypal *et al.*, 2005). Existem também, relatos de lesões endometriais granulomatosas causadas por *Leishmania* em cadelas que sofreram abortos nos últimos estádios de gestação (46-48 dias) e de morte de um cachorro de 4 dias cuja mãe de 4 anos apresentava leishmaniose, o que sugere a possibilidade de transmissão transplacentarária (Ciaramella e Corona, 2003). Suspeita-se, ainda, de que possa ocorrer transmissão direta entre cães através de mordedelas ou feridas, o que poderá explicar a presença de casos clínicos de LCan autótones em áreas não endémicas com ausência de vetores aparentes. Foram encontrados outros artrópodes hematófagos infetados com *Leishmania* spp., como carraças e pulgas; no entanto, não existe qualquer evidência de que transmitam o protozoário (Solano-Gallego *et al.*, 2011) (Figura 6).



**Figura 6** – Ciclo de vida de *L. infantum* com indicação das prováveis e menos prováveis vias de transmissão para os cães (adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011).

## 1.4. Patogenia

O parasitismo intracelular, nomeadamente dos macrófagos, inicia-se quando o vetor inocula as formas infetantes, promastigotas metacíclicas, juntamente com a sua saliva na pele do hospedeiro vertebrado. Neste local origina-se uma reação inflamatória localizada que, por sua vez, atrai outras células, como neutrófilos, histiócitos, macrófagos e monócitos, tendo estes dois últimos tipos de células um papel importante no processo de fagocitose. Após fagocitose, estas formas parasitárias, promastigotas, diferenciam-se em amastigotas, multiplicando-se no interior dos fagolisossomas. Quando ocorre a rutura do macrófago, as formas amastigotas livres infetam novas células, podendo disseminar-se por todo o corpo do hospedeiro vertebrado, preferivelmente para órgãos hemolinfáticos, como linfonodos, baço, medula óssea, fígado e outras áreas cutâneas distintas e remotas, estabelecendo, assim, uma infeção sistémica (Pangrazio *et al.*, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Nem todos os cães experimental ou naturalmente infetados por *Leishmania* desenvolvem a doença (Killick-Kendrick *et al.*, 1994; Pinelli *et al.*, 1995; Baneth e Solano-Gallego, 2012). A reação imunitária do hospedeiro vertebrado após pós-infeção desempenha um papel importante para que o cão desenvolva uma infeção generalizada com repercussões clínicas mais ou menos graves ou para que progrida de um estado subclínico. Os cães podem ser considerados suscetíveis ou resistentes do ponto de vista do desenvolvimento de doença em termos clínicos. Os primeiros são aqueles que apresentam predisposição para desenvolver a doença após a infeção, enquanto os segundos são os que possuem a capacidade de restringir a infeção, de modo a manterem-se aparentemente saudáveis por longos períodos de tempo. No entanto, o estado subclínico não é, necessariamente, permanente, sendo que determinados fatores, como condições imunossupressoras e doenças concomitantes, podem interromper o equilíbrio, levando à progressão da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

A resposta imunitária inata ou não específica é a primeira linha de defesa contra *Leishmania*, quando este agente infecta um hospedeiro vertebrado. Um dos mecanismos pelos quais as formas amastigotas conseguem evitar esta resposta imunitária é a capacidade que possuem em sobreviver e replicarem-se no interior dos fagolisossomas macrofágicos, inibindo a sua maturação através da produção de compostos, tais como os lipofosfolípidos (Sacks e Sher, 2002).

*Leishmania infantum* aparenta induzir uma resposta imunitária celular mista entre linfócitos Th1 e Th2, quer em cães subclínicos, quer em cães doentes (Baneth *et al.*, 2008) (Figura 7).

Tendo em conta estudos recentes, é largamente aceite que os macrófagos desempenham um papel deveras importante nas infeções por *Leishmania*. Certas citocinas, como o interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2) e o fator alfa de necrose dos tumores (TNF- $\alpha$ ), produzidas pelas células Th1, induzem a atividade dos macrófagos contra as leishmânias (Baneth *et al.*, 2008). A produção de óxido nítrico pelos macrófagos é o principal mediador de morte intracelular das formas amastigotas, através de morte celular apoptótica controlada por inibidores proteicos (Holzmuller *et al.*, 2006).

As populações quer de linfócitos quer de outras células da linha branca, alteram-se no decurso da doença. Através da análise, por citometria de fluxo, de células mononucleares do sangue periférico e esplenócitos demonstrou-se que a forma mais grave da doença e mais elevado grau de parasitismo são acompanhados pela diminuição das células T CD4+, CD5+ e CD8+, linfócitos B CD21+ e monócitos. Ao contrário, o aumento dos níveis de células T CD8+ é a principal característica da infeção subclínica e reduzido parasitismo (Reis *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2009).

À medida que a infeção evolui para doença clínica, a produção de interleucinas pelo fenótipo Th-2 aumenta, mais especificamente IL-4, IL-6 e IL-10 (Pumarola *et al.*, 1991; Pinelli *et al.*, 1994; Ciaramella e Corona, 2003). Com isto, existe uma depressão da imunidade celular e um estímulo da imunidade humoral, mais precisamente dos linfócitos B, que, conseqüentemente, produzem anticorpos que não são protetores e significam falha no controlo da infeção (Baneth *et al.*, 2008). As regiões dos linfócitos T nos órgãos linfóides começam a esgotar-se e as regiões das células B começam a proliferar. A proliferação dos linfócitos B, plasmócitos, histiócitos e macrófagos resulta numa linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia e hiperglobulinemia. O excesso de imunoglobulinas (Ig) produzido causa uma hipergamoglobulinemia crónica, não apresentando acção protectora, podendo, eventualmente, ser prejudicial (Lucena e Ginel, 1998; Smith *et al.*, 2004). Devido a isto ocorre a formação de inúmeras quantidades de imunocomplexos circulantes (CIC), combinações de anticorpos, antigénios e frações com complemento (Lopez *et al.*, 1996). Estes podem depositar-se na parede dos vasos sanguíneos, causando vasculite, poliartrite, uveíte e glomerulonefrite. A deposição destes nos rins poderá causar insuficiência renal, principal causa de morte em cães com leishmaniose. Os CIC podem, também, induzir vasculite,



## 1.5. Sinais clínicos

A LCan é, geralmente, uma doença crônica (Ciaramella *et al.*, 1997), sendo que os seus sinais clínicos podem desenvolver-se de 3 meses até 7 anos após a infecção (Baneth e Solano-Gallego, 2012). É uma doença na qual a doença clínica não corresponde à infecção devido à alta prevalência de infecção subclínica (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Baneth *et al.*, 2008). Sendo uma doença sistêmica pode, potencialmente, envolver qualquer órgão e tecido, manifestando-se por uma multiplicidade de sinais clínicos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). As manifestações clínicas da leishmaniose variam amplamente como consequência de numerosos mecanismos patogênicos no processo da doença, de diferentes órgãos afetados e da diversidade de respostas imunitárias reproduzidas pelo hospedeiro vertebrado (Baneth *et al.*, 2008).

Os sinais clínicos mais frequentemente encontrados ao exame físico em casos de LCan incluem lesões de pele, linfadenomegalia local ou generalizada, perda de peso corporal, intolerância ao exercício, diminuição do apetite, letargia, esplenomegalia, poliúria e polidipsia (pu/pd), lesões oculares, epistaxis, onicogribose, claudicação, vômitos e diarreia (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Baneth *et al.*, 2008). A variedade de sinais clínicos não específicos faz com que a lista de diagnósticos diferenciais de LCan seja bastante ampla (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

### 1.5.1. Alterações cutâneas

As alterações dermatológicas são as manifestações mais frequentes da LCan sendo que a sua prevalência varia entre 56 e 90% (Slappendel, 1988; Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999). As lesões cutâneas podem ocorrer na ausência ou juntamente com outros sinais clínicos, mas qualquer animal que as apresente é provável que possua envolvimento visceral, pois os parasitas disseminam-se por todo o corpo antes de as lesões cutâneas generalizadas se desenvolverem (Koutinas *et al.*, 1992; Font *et al.*, 1996; Koutinas *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

As alterações cutâneas variam em características e extensão, sendo, raramente, pruriginosas (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Foram descritas inúmeras entidades dermatológicas: 1) dermatite esfoliativa não pruriginosa, com ou sem alopecia, que pode ser generalizada ou localizada sobre o focinho, orelhas e membros, 2) dermatite ulcerativa nas

proeminências ósseas, junções mucocutâneas, membros (almofadinhas plantares) e pavilhões auriculares, 3) dermatite nodular focal ou multifocal, 4) dermatite proliferativa mucocutânea e 5) dermatite papular (Ordeix *et al.*, 2005; Bottero *et al.*, 2006) (Figura 8).

Manifestações cutâneas atípicas como despigmentação, paniculites, hiperqueratose nasal e digital, erupção pustular, alopecia areata ou pênfigo foliáceo, e eritema multiforme são relativamente pouco frequentes (Blavier *et al.*, 2001; Papadogiannakis *et al.*, 2005), enquanto pioderma por estafilococos, superficial ou profundo, é uma complicação relativamente mais frequente (Solano-Gallego *et al.*, 2009).



**Figura 8** – Dermatite exfoliativa não pruriginosa num cão diagnosticado com leishmaniose (fotografia de André Vieira).

No exame de pele é possível, também, observar a presença de nódulos não ulcerados de variados diâmetros (1-10 cm), semelhante ao granuloma macrofágico anérgico encontrado na leishmaniose cutânea em seres humanos (Ciaramella e Corona, 2003).

### 1.5.2. Linfadenomegalia e esplenomegalia

A linfadenomegalia é outro dos sinais clínicos frequentes, estando presente em 89% dos casos (Ciaramella e Corona, 2003), caracterizando-se por um aumento do volume dos linfonodos, localizado ou generalizado. Este pode ser 2-6 vezes o tamanho normal, mimetizando ocasionalmente os sinais clínicos de linfoma (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Este fenómeno inicia-se com alterações vasculares (hiperémia) e com hiperplasia marcada das células reticulares dos seios medulares, sendo observada a presença de grandes quantidades de hemossiderina no citoplasma destas células. Os cordões medulares estão, frequentemente, reduzidos e são constituídos maioritariamente por linfócitos e células plasmáticas. Na zona cortical destaca-se a desorganização dos folículos linfóides, podendo ocorrer fenómenos simultâneos de hiperplasia, hipoplasia e, inclusive, desaparecimento de folículos, aparecendo as populações celulares predominantes, células reticulares, plasmáticas e linfócitos, distribuídas de forma irregular (Martínez-Moreno *et al.*, 1999).

É de notar que a linfadenopatia é detetada no exame físico, principalmente, nos linfonodos pré-escapulares e poplíteos (Koutinas *et al.*, 1999), mas com maior frequência nos

primeiros (Ciaramella *et al.*, 1997), pois estes situam-se próximos das principais regiões de transmissão, como orelhas e focinho (Lima *et al.*, 2004). Esta alteração pode ocorrer, também, em outros linfonodos como os mesentéricos, mediastínicos e periféricos (Petersen, 2009).

A esplenomegalia é um sinal clínico presente em 54% dos casos (Ciaramella e Corona, 2003), sendo que a principal lesão consiste numa inflamação hiperplásica com depleção linfocitária (Martínez-Moreno *et al.*, 1999).

As alterações mais importantes ocorrem na polpa branca, em que se evidencia uma clara disfunção linfocitária com redução, atrofia e mesmo ausência dos folículos linfóides. Na zona marginal destaca-se a hiperplasia das células reticulares em torno das pequenas artérias. A polpa vermelha sofre, também, alterações, observando-se fenómenos de hiperemia e micro-hemorragias, e, em especial, uma hiperplasia muito marcada das células reticulares nos cordões, sendo que em certas ocasiões chega a provocar um elevado grau de desorganização da massa esplénica (Martínez-Moreno *et al.*, 1999).

A esplenomegalia pode ser detetada por auxílio de meios imagiológicos, raio-X e ecografia abdominal (Koutinas *et al.*, 1999), e por meio de palpação abdominal (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

### **1.5.3. Alterações renais**

Em cães doentes é essencial avaliar a função renal e classificar o estágio da doença renal utilizando as recomendações da International Renal Interest Society (IRIS), uma vez que a LCan está intimamente relacionada com uma prevalência considerável de insuficiência renal crónica (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A poliúria e/ou polidipsia podem indicar lesão renal (Ciaramella e Corona, 2003), e esta pode ser a única alteração clínica da LCan, variando desde proteinúria moderada até síndrome nefrótica ou insuficiência renal crónica (IRC) (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Vários estudos referem a presença de lesões histológicas renais em 100% dos animais avaliados (Costa *et al.*, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Estas afetam os glomérulos, túbulos e tecido intersticial. As primeiras alterações afetam o sistema tubular, resultando numa tubulonefrose com degeneração das células da parede, por fenómenos de tumefação turva, degeneração vacuolar e perda de microvilosidades, podendo, também, ocorrer processos de necrose isolados. As lesões glomerulares aparecem mais tarde, manifestando-se de forma variada, sendo a mais notável a glomerulonefrite membranoproliferativa que se

caracteriza pelo espessamento da membrana basal dos glomérulos, pelo depósito de substância hialina e pela proliferação de células endoteliais e mesangiais (Martínez-Moreno *et al.*, 1999). A glomerulonefrite pode, também, ocorrer devido à deposição de imunocomplexos nos glomérulos (Martínez-Moreno *et al.*, 1999; Plevraki *et al.*, 2006). Outro tipo de lesão renal é a nefrite intersticial difusa, em que se destaca o edema e um infiltrado celular abundante (Martínez-Moreno *et al.*, 1999).

Apesar da elevada prevalência desta patologia, a típica azotemia da insuficiência renal é um dado laboratorial pouco frequente e é, apenas, evidente quando a maioria dos nefrônios se tornam disfuncionais durante a evolução da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A lesão renal pode manifestar-se, também, por edema periférico, ascites e proteinúria (Ciaramella e Corona, 2003).

Estas lesões renais podem causar hipertensão que por sua vez agrava, ainda mais, a patologia renal (Saridomichelakis, 2009). Assim sendo, o diagnóstico precoce da doença renal, o tratamento e uma dieta apropriada são deveras benéficos para o animal, podendo prolongar a sua vida (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

#### 1.5.4. Atrofia muscular

A perda de peso e a atrofia muscular são os sinais clínicos mais frequentes do envolvimento visceral (Baneth e Solano-Gallego, 2012) (Figura 9).

A atrofia muscular progressiva está associada a uma polimiosite crónica que afeta os músculos esqueléticos, incluindo os mastigatórios (Vamvakidis *et al.*, 2000; Troxel, 2009). Macroscopicamente, os músculos apresentam áreas de tumefação, com consistência macia de cor branco-acinzentada, situadas no interior das porções normais do músculo (Blavier *et al.*, 2001). Na avaliação histológica observam-se a presença de lesões inflamatórias e degenerativas, em que aos infiltrados mononucleares se encontram associadas formas amastigotas (Blavier *et al.*, 2001). Além disso, a atrofia muscular caracteriza-se por uma vasculite neutrofílica e deposição de imunocomplexos no tecido muscular, em conjunto com os anticorpos séricos anti-



**Figura 9** – Cão com caquexia, atrofia muscular e descamação excessiva (adaptado de Baneth e Solano-Gallego, 2012).

miofribilhas (Vamvakidis *et al.*, 2000; Baneth *et al.*, 2008).

A atrofia inicia-se nos músculos da cabeça, dando ao cão um aspeto de animal velho. Esta é mais evidente nos músculos mastigatórios, sendo menos acentuada nos restantes músculos esqueléticos.

Apesar de esta atrofia ser bastante observada na LCan, o sistema muscular raramente apresenta lesões isoladas de outras (Blavier *et al.*, 2001).

A perda de peso pode ser associada à anorexia, sendo que nalguns casos os cães apresentam perda da condição corporal apesar de possuírem um apetite voraz; à competição nutricional entre hospedeiro e parasita; à reduzida absorção intestinal e à patologia renal crónica (Saridomichelakis, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

### 1.5.5. Distúrbios hemorrágicos

Cães com leishmaniose podem apresentar sinais de diátese hemorrágica, manifestando-se, sobretudo, como epistaxis e menos vulgarmente como hematúria e diarreia hemorrágica (Baneth e Solano-Gallego, 2012). A epistaxis, habitualmente unilateral e intermitente (Ciaramella e Corona, 2003) (Figura 10), apresenta-se como o resultado de



**Figura 10** – Epistaxis num cão diagnosticado com leishmaniose (adaptado de Baneth e Solano-Gallego, 2012).

múltiplos e variados fatores envolvidos na hemostase primária e secundária, como vasculite mediada por imunocomplexos (Ciaramella e Corona, 2003), disfunção plaquetária, trombocitopenia, diminuição do fator de coagulação, fibrinólise (Baneth *et al.*, 2008), trombocitopatia, hiperviscosidade sérica induzida por hiperglobulinemia e rinite linfoplasmocítica ou granulomatosa com ou sem ulceração nasal (Juttner *et al.*, 2001; Ciaramella *et al.*, 2005; Petanides *et al.*, 2008).

Na LCan existem distúrbios hemorrágicos que são mais evidentes em animais num estágio avançado da doença, nos quais o processo inflamatório, lesões renais e hepáticas, e um estado de imunodepressão podem influenciar a função plaquetária, bem como a síntese e metabolismo dos fatores de coagulação (Ciaramella *et al.*, 2005).

Uma epistaxis profusa pode ser o único sinal clínico existente, podendo ser a causa de morte do animal devido a uma perda de sangue descontrolada (Baneth *et al.*, 2008).

### 1.5.6. Alterações locomotoras

Os sinais osteoarticulares são poucos frequentes, mas manifestam-se através de lesões simétricas e bilaterais com claudicação intermitente (Blavier *et al.*, 2001; Pugliese *et al.*, 2006), e poliartrites erosivas e não erosivas (Ciaramella e Corona, 2003; Pugliese *et al.*, 2006).

A poliartrite é o resultado de uma reação de hipersensibilidade de tipo III com depósito de imunocomplexos nas articulações. A mais frequente é a do tipo não erosivo, podendo estar associada ou não a sinovite (Blavier *et al.*, 2001).

Aquando do exame físico o animal pode sentir desconforto e, inclusive, dor durante a palpação diafisária e/ou durante os movimentos de flexão e extensão articular (Ciaramella e Corona, 2003).

Radiograficamente, nas diáfises de ossos longos, patela e pélvis pode-se visualizar uma reação perióstea com aumento da radiopacidade, com danos medulares e corticais, enquanto nas articulações pode-se visualizar lesões osteolíticas (Pugliese *et al.*, 2006).

As leishmânias podem ser isoladas em processos de biópsia óssea e aspiração do líquido sinovial (Ciaramella e Corona, 2003; Pugliese *et al.*, 2006).

### 1.5.7. Lesões oculares

As lesões oculares estão presentes em 16-80.5% dos casos de LCan (Baneth *et al.*, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012), sendo que as mais frequentes envolvem a câmara anterior do olho e incluem conjuntivite, blefarite (esfoliativa, ulcerativa ou nodular), uveíte



**Figura 11** – Uveíte num cão diagnosticado com leishmaniose (fotografia gentilmente cedida pelo Dr. Hugo Vilhena, HVBV).

anterior (Figura 11), queratoconjuntive comum ou seca (QCS) (Figura 12), queratite e esclerite (Koutinas *et al.*, 1999; Naranjo *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Histopatologicamente, ocorre uma inflamação de granulomatosa a linfoplasmocítica, num padrão nodular, perivascular ou difuso, devido à presença das formas amastigotas parasitárias nos tecidos oculares,

particularmente na conjuntiva, limbo e corpo ciliar (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Na QCS o infiltrado inflamatório localizado em torno dos ductos lacrimais provoca a retenção da secreção e diminuição da produção lacrimal (Baneth *et al.*, 2008). A possibilidade de formação de sinequias posteriores pode levar à ocorrência de glaucoma, resultado da obstrução pupilar (Ciaramella e Corona, 2003).



**Figura 12** – QCS num cão diagnosticado com leishmaniose (fotografia gentilmente cedida pelo Dr. Hugo Vilhena, HVBV).

Consequências oculares de hipertensão arterial sistémica, como descolamento e/ou hemorragias da retina, tortuosidade arterial da retina e hifema são raras, sendo observadas em cães com leishmaniose e hipertensos (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

#### **1.5.8. Sinais clínicos menos comuns**

Outras manifestações clínicas menos comuns incluem lesões na mucosa (cavidade oral, língua e órgãos genitais), hepatite crónica, transtornos cardiovasculares, tais como, tamponamento cardíaco, coagulação intravascular disseminada, vasculite sistémica e tromboembolismo, pancreatite, meningite, colite crónica, sinais respiratórios, despigmentação das narinas e dermatofibrose nodular (Blavier *et al.*, 2001; Ciaramella e Corona, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

#### **1.6. Diagnóstico**

A pesquisa de infeção por *Leishmania* é realizada, sobretudo, com alguns dos fins a seguir indicados: confirmar a doença em cães com sinais clínicos e/ou alterações clinicopatológicas; detetar cães clinicamente saudáveis que vivem ou viajam em áreas endémicas; selecionar dadores de sangue; evitar a importação de cães infetados para áreas não endémicas; e monitorizar a resposta ao tratamento (Miró *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011). O diagnóstico deve ter por base uma abordagem completa, considerando a história pregressa do animal, o exame físico, dados laboratoriais básicos (não específicos), os resultados de análises que detetam o parasita e/ou os que avaliam

e quantificam a resposta imunitária específica do hospedeiro vertebrado (Martínez-Moreno *et al.*, 1999; Paltrinieri *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011).

### **1.6.1. Análises laboratoriais não específicas**

Os testes laboratoriais básicos são constituídos pelo hemograma (CBC), perfil bioquímico, análise de urina e electroforese sérica. Estes testes podem contribuir para a suspeita da doença através da deteção de uma ou mais alterações associadas à mesma. Com base nestes resultados podem ser necessários outro tipo de análises laboratoriais (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Paltrinieri *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Uma anemia não regenerativa, moderada a grave, normocítica e normocrómica é encontrada com relativa frequência na LCan (Koutinas *et al.*, 1999; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Esta poderá ser consequência de uma diminuição da eritropoiese, devido à doença crónica, insuficiência renal crónica, deficiência em ferro e displasia eritróide, pela perda de sangue, através da epistaxis, pela hemólise e infeções/doenças concomitantes (Saridomichelakis, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Leucocitose moderada, leucopenia e pancitopenia são dados inconstantes. No entanto, a linfopenia é frequentemente encontrada em cães com leishmaniose (Petanides *et al.*, 2008). Hiperviscosidade plasmática, trombocitopenia (Petanides *et al.*, 2008), trombocitopenia imuno-mediada secundária (Terrazzano *et al.*, 2006; Cortese *et al.*, 2009), hemostase secundária debilitada e fibrinólise podem ser, também, encontradas (Ciaramella *et al.*, 2005).

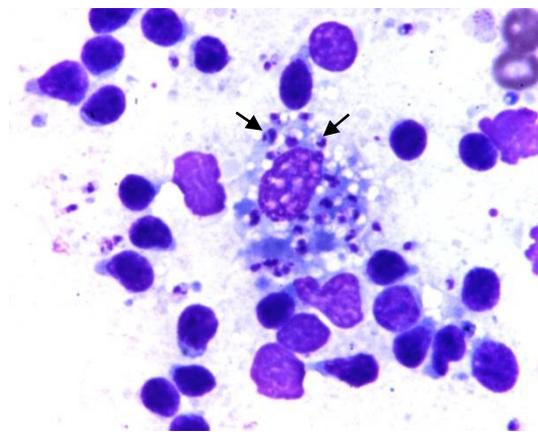
Em termos bioquímicos observa-se uma hiperproteinemia sérica com hiperglobulinemia policlonal  $\beta$  e  $\gamma$ , e hipoalbuminemia, associada à perda de proteína por nefropatia, doença hepática, malnutrição ou à combinação destes fatores, resultantes da diminuição do rácio albumina/globulina (Koutinas *et al.*, 1999; Baneth e Solano-Gallego, 2012). As proteínas da fase aguda encontram-se, igualmente, aumentadas (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Sinais de comprometimento estrutural e funcional hepático são relativamente frequentes, incluindo um aumento moderado das enzimas alanina amino-transferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), e hipercolesterolemia (Palacio *et al.*, 1995; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Nos animais que possuem quadro clínico compatível com insuficiência renal crónica observa-se um rácio proteína/creatinina urinária (UP/C)  $\geq 0.5$  ou uma azotemia renal com valores de creatinina sérica, ureia nitrogenada sérica (BUN) e fosfato sérico aumentados (Koutinas *et al.*, 1999; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

### 1.6.2. Avaliação citológica

A citologia é um meio que nos permite diagnosticar rapidamente a infecção através da análise de amostras, devidamente coradas, de variados tecidos, como linfonodos, baço, pele e medula óssea (Baneth e Aroch, 2008; Maia e Campino, 2008). É um método minimamente invasivo que, geralmente, não requer anestesia nem analgesia. Quando um diagnóstico definitivo pode ser efetuado citologicamente, diagnósticos adicionais, como histopatologia e cultura, não são, muitas vezes, necessários (MacNeill, 2011).

Este processo pode envolver aspiração por agulha fina de nódulos papulares e lesões cutâneas ulceradas, podendo estas últimas ser avaliadas, também, por aposição, e qualquer fluido biológico obtido dos órgãos afetados, como líquido sinovial, em casos de artrite ou poliartrite, e líquido cefalorraquidiano quando existe presença de sinais neurológicos (Paltrinieri *et al.*, 2010). O procedimento de eleição no cão é a observação de esfregaços por aspiração de linfonodos ou medula óssea. A punção realiza-se, sobretudo, nos linfonodos poplíteos ou pré-escapulares, utilizando-se agulha fina. A punção medular efetua-se na face interna do fêmur, na crista íliaca ou na união costochondral (Martínez-Moreno *et al.*, 1999). Estes dois métodos podem originar resultados falsos negativos devido ao reduzido número de formas parasitárias nestes dois tecidos, especialmente em cães com infecção subclínica (Gomes *et al.*, 2008), podendo o mesmo ocorrer em cães doentes (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A avaliação citológica é efetuada utilizando esfregaços em lâmina corados pelo Giemsa, sendo observados ao microscópico ótico nas ampliações de x400 e x1000 (Maia e Campino, 2008; Gramiccia, 2011). As formas amastigotas são encontradas livre ou



**Figura 13** – Citologia de medula óssea. Presença de amastigotas de *Leishmania* de forma livre e no interior do macrófago (fotografia de André Vieira).

intracelularmente nas células mononucleares, mais precisamente em monócitos, macrófagos ou neutrófilos, apresentando-se como corpos ovais arredondados, diâmetro de 2-4  $\mu\text{m}$ , de citoplasma azul pálido e com um núcleo relativamente grande de coloração avermelhada. O cinetoplasto apresenta-se como uma estrutura vermelha ou violeta (Maia e Campino, 2008) (Figura 13).

Ao observarmos as formas amastigotas nos tecidos em estudo, os cães são considerados infetados. Contudo, se estas não forem

visualizadas torna-se necessário a realização de testes serológicos ou outros, por exemplo PCR, de forma a clarificar se o cão se encontra infetado com *Leishmania* (Paltrinieri *et al.*, 2010).

### **1.6.3. Avaliação histopatológica**

A análise histopatológica é efetuada através de biópsia, recorrendo-se ao uso de microscópio e coloração, por exemplo, de hematoxilina-eosina (Maia e Campino, 2008). Os tecidos utilizados para a deteção das formas amastigotas incluem pele, baço, fígado, linfonodos e medula óssea (Gomes *et al.*, 2008). Esta técnica é demorada e a identificação das formas parasitárias livres ou no interior dos macrófagos dos tecidos é deveras difícil (Maia e Campino, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). A imuno-histoquímica pode ser bastante útil na ajuda ao diagnóstico através da avaliação histopatológica, particularmente em órgãos que não possuam elevada carga parasitária (Maia e Campino, 2008). A especificidade deste método é, praticamente, de 100%, mas depende do tempo gasto na procura dos parasitas, enquanto no que diz respeito à sensibilidade, esta é, aproximadamente 80% em cães com sinais clínicos de doença e baixa nos cães seropositivos mas sem sinais clínicos ou alterações laboratoriais/clinicopatológicas (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

### **1.6.4. Cultura**

Procedimento que permite a multiplicação de parasitas a partir de tecidos infetados (Solano-Gallego *et al.*, 2009), sendo que a cultura de diferentes tecidos permite melhorar a sensibilidade de deteção do parasita (Maia e Campino, 2008).

Apesar de possuir uma especificidade de 100%, atualmente não se utiliza com tanta frequência, uma vez que possui algumas desvantagens: requer um período de incubação longo (Gramiccia, 2011), não permite um diagnóstico rápido (Solano-Gallego *et al.*, 2009), é passível de contaminação microbiológica, depende da carga parasitária e é de difícil realização (Maia e Campino, 2008). No entanto, é o único procedimento que permite isolar e manter a população infetante original (Gramiccia, 2011). A sua utilização tem, quase exclusivamente, fins de investigação (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

### 1.6.5. Métodos serológicos

O diagnóstico de LCan pode ser realizado pela detecção de anticorpos específicos (IgG) usando técnicas sorológicas quantitativas, como a imunofluorescência indireta (IFAT - “immunofluorescence antibody test”), o teste imunoenzimático (ELISA - “enzyme-linked immunosorbent assay”) e o teste aglutinação direta (DAT - “direct agglutination test”), e testes rápidos imunocromatográficos e a imunodeteção (WB - “Western blotting”) (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Em geral, a maioria destes métodos apresentam boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de leishmaniose. No entanto, estas propriedades dependem dos antígenos utilizados (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* é indicativa de exposição ao parasita, sendo baixa, possivelmente, em cães que estiveram expostos mas não desenvolveram doença clínica, e alta em cães doentes ou com infecção subclínica (Baneth e Aroch, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011). É possível verificar-se reação sorológica cruzada com outros agentes patogênicos em alguns testes sorológicos (Baneth e Aroch, 2008; Miró *et al.*, 2008).

O teste IFAT, que utiliza promastigotas inteiros como antígeno (Solano-Gallego *et al.*, 2009), é aplicável em estudos epidemiológicos, na prática clínica e na monitorização do tratamento. No entanto, a sua realização necessita de elevada experiência por parte do operador, bem como de equipamento laboratorial apropriado. É necessário efetuar uma série de diluições séricas seriadas em lâminas de vidro revestidas pelo antígeno em que os anticorpos são revelados através do uso de conjugados anti-anticorpos com um elemento fluorescente, o que faz com que este teste seja bastante laborioso e pouco adequado à análise de grandes quantidades de amostras (Maia e Campino, 2008; Gramiccia, 2011).

A intensidade da fluorescência é avaliada recorrendo-se a uma avaliação microscópica, mas esta é subjetiva em títulos de baixa positividade (Gramiccia, 2011). Nas amostras, aquelas em que os parasitas apresentam uma fluorescência homogênea verde são consideradas positivas, enquanto aquelas em que a coloração é vermelho opaco são consideradas negativas (Maia e Campino, 2008). Esta técnica é muito útil para distinguir cães subclínicos, que apresentam geralmente títulos baixos, daqueles com disseminação parasitária e doença, que apresentam títulos elevados (Gramiccia, 2011). Contudo, apesar de possuir sensibilidade e especificidade elevada em cães doentes, pode falhar em sensibilidade nos subclínicamente infetados (Maia e Campino, 2008).

O teste ELISA consiste num ensaio imunoenzimático fácil e simples que permite analisar um número elevado de amostras em pouco tempo (Maia e Campino, 2008; Gramiccia, 2011). Existe a produção de uma reação colorimétrica, que pode ser quantificada por espectrofotometria (Paltrinieri *et al.*, 2010). Possui uma sensibilidade elevada, que diminui quando são utilizados múltiplos antigénios, como antigénios purificados, péptidos sintéticos definidos e proteínas recombinantes em cães com infeção subclínica (Maia e Campino, 2008; Gramiccia, 2011).

Os testes rápidos imunocromatográficos, qualitativos, baseiam-se em antigénios recombinantes ou purificados (Miró *et al.*, 2008), são de uso fácil e permitem obter o resultado no momento (Solano-Gallego *et al.*, 2011). O aparecimento de duas linhas, uma de controlo e outra de teste, independentemente da intensidade da coloração, indica um resultado positivo (Maia e Campino, 2008). Apesar destas vantagens, este método serológico qualitativo apresenta uma sensibilidade mais baixa que os testes de IFAT e ELISA, sendo que os principais problemas são a ocorrência de falsos negativos e a impossibilidade de titular os anticorpos em resultados positivos (Gramiccia, 2011).

O DAT utiliza promastigotas coradas, em suspensão ou liofilizadas. É uma técnica barata e de simples realização, sendo ideal para uso no terreno e laboratorial. Contudo, o facto de o período de incubação ser longo (18 horas) é uma limitação deste (Martínez-Moreno *et al.*, 1999; Maia e Campino, 2008).

O WB é um teste que utiliza extratos parasitários como antigénio, não sendo aplicável ao diagnóstico de rotina mas sim à investigação. Este método requer perícia técnica e um período de tempo alargado para a sua realização, sendo algo complicado e de custos elevados. É considerado sensível quando existe baixo título de anticorpos e altamente específico para o diagnóstico de leishmaniose visceral (Gomes *et al.*, 2008; Maia e Campino, 2008).

#### **1.6.6. Métodos moleculares**

O diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase (PCR - “polymerase chain reaction”) é baseado na amplificação *in vitro* de sequências específicas de nucleótidos presentes no parasita, incluindo o gene codificador de ARN ribossómico (rRNA), o “internal transcribed spacer” (ITS) do operão ribossomal e ADN do cinetoplasto (kDNA) (Gomes *et al.*, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Esta técnica sensível e específica é, não só, utilizada como fonte de diagnóstico, mas também em estudos de investigação e rastreio em

cães que irão ser dadores de sangue (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Baneth e Solano-Gallego, 2012). A PCR pode ser efetuada, regularmente, a partir de sangue inteiro, camada leucocitária (“buffy coat”), fluídos corporais, amostras histopatológicas, medula óssea, linfonodos, pele ou zaragatoas conjuntivais (Maia e Campino, 2008; Miró *et al.*, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012), e menos comumente em órgãos como baço, pulmão, coração, pênis, vagina, testículos, sémen, útero, placenta, rim, intestino, leite e urina (Maia e Campino, 2008).

Os três protocolos mais utilizados são: PCR convencional, PCR “nested” (incluindo “semi-nested”) e PCR em tempo real (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011).

Na PCR convencional utilizam-se sequências oligonucleotídicas (“primers”), para amplificar o ADN de *Leishmania* (Gramiccia, 2011). Na PCR “nested” ou “semi-nested” são realizadas duas amplificações consecutivas com primers internos, para assim aumentar a sensibilidade (Paltrinieri *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011). A PCR qualitativa pode ser de extrema utilidade, especialmente em casos com resultados serológicos dúbios (Gomes *et al.*, 2008). A PCR em tempo real é utilizada para quantificar a carga parasitária e a sua distribuição nos tecidos, a cinética de infeção e monitorizar a resposta à terapêutica, permitindo aproximar-se do prognóstico de recidivas a partir de uma carga parasitária residual pós-tratamento (Gomes *et al.*, 2008; Maia e Campino, 2008; Gramiccia, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011). As vantagens desta técnica comparativamente ao convencional são: diminuição do tempo de ensaio, menor risco de contaminação e maior sensibilidade (Maia e Campino, 2008).

Um resultado de PCR negativo num cão clinicamente suspeito não é suficiente para descartar a infeção. Por vezes, são obtidos resultados variados e discordantes a partir de diferentes tecidos pertencentes ao mesmo cão. Tal facto pode ser justificado pela distribuição heterogénia do parasita em cada tecido, pela carga parasitária associada ao tropismo da estirpe e pela resposta imunitária local (Maia e Campino, 2008).

A interpretação dos resultados da PCR deve ser efetuada de forma cautelosa em cães clinicamente saudáveis, tendo em consideração o propósito do procedimento de diagnóstico. Por exemplo, a PCR é de extrema utilidade, em combinação com testes serológicos quantitativos, na identificação de cães infetados que possam viajar para áreas não endémicas e, assim, propagar a infeção através dos vetores locais, e na prevenção da transmissão através do rastreio de cães dadores de sangue. No entanto, a decisão de tratar um cão, clinicamente saudável, baseado apenas num resultado de PCR positivo não é recomendada (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

As amostras destinadas a PCR podem ser frescas, congeladas ou, então, conservadas em álcool etílico a 95% (Paltrinieri *et al.*, 2010).

### **1.7. Tratamento**

A LCan é muito mais resistente à terapêutica que a leishmaniose visceral (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

O tratamento de LCan é considerado uma questão difícil, uma vez que é moroso, de elevado custo e, por vezes, apenas parcialmente eficaz. Na maioria das ocasiões não se consegue eliminar totalmente os parasitas, mas apenas a remissão dos sinais clínicos e alterações clínico patológicas (cura clínica) (Miró *et al.*, 2008) e a diminuição no tempo (aproximadamente 4 meses) da capacidade infecciosa para os vetores. Os animais podem permanecer sorológica e parasitologicamente positivos, sendo por vezes necessários repetidos tratamentos para contínua remissão da sintomatologia (Baneth e Aroch, 2008).

A resposta clínica de cães doentes ao tratamento pode variar de fraca a boa, dependendo do seu estado clinicopatológico inicial e a sua resposta específica ao tratamento instituído. Espera-se que cães com insuficiência renal tenham uma percentagem de recuperação menor comparativamente àqueles que não desenvolvem comprometimento renal ou, apenas, possuem proteinúria moderada (Solano-Gallego *et al.*, 2011). A maioria dos cães sujeitos à terapêutica revela melhorias clínicas durante o primeiro mês, embora noutros seja necessário um período mais longo para se observar qualquer tipo de melhoria. Os títulos de anticorpos e os níveis de proteínas séricas requerem um longo período de tempo até normalização (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Os fármacos mais utilizados no tratamento de LCan são o alopurinol, antimoniato de meglumina e miltefosina, sendo os últimos dois licenciados na Europa (Solano-Gallego *et al.*, 2009). As opções terapêuticas e a escolha dos fármacos a utilizar devem ter em consideração as diferentes formas clínicas da doença (Oliva *et al.*, 2010). Para tal, um sistema de quatro estádios clínicos baseado nos sinais clínicos, alterações clinicopatológicas e condição sorológica foi proposto pelo grupo LeishVet (Tabela 1) na tentativa de cobrir o amplo espectro de manifestações e graus de gravidade da LCan. Consoante cada estágio existe um protocolo de tratamento e prognóstico diferente. (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

**Tabela 1** - Estadiamento clínico da leishmaniose canina com base na sorologia específica, sinais clínicos, dados laboratoriais, tipo de terapia e prognóstico para cada fase (adaptado de Solano-Gallego et al., 2011).

<b>Estádios clínicos</b>	<b>Serologia</b>	<b>Sinais clínicos</b>	<b>Dados laboratoriais</b>	<b>Terapia</b>	<b>Prognóstico</b>
<b>Estádio I Doença ligeira</b>	Níveis de anticorpos negativos a positivos baixos	Cães com sinais clínicos moderados, como linfadenomegalia periférica ou dermatite papular	Sem alterações clinicopatológicas Perfil renal normal: creatinina sérica <1,4 mg/dl; não proteinúrico: rácio proteína creatinina urinária (UP/C) <0,5	Alopurinol ou antimoniato de meglumina ou miltefosina/alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol+miltefosina	Favorável
<b>Estádio II Doença moderada</b>	Níveis de anticorpos positivos baixos a altos	Cães com os sinais anteriores mais lesões cutâneas simétricas ou difusas, como dermatite exfoliativa, onicogribose, ulceração, anorexia, perda de peso, febre e epistaxis	Alterações clinicopatológicas como anemia não regenerativa moderada, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome de hiperviscosidade sérica Subestádios: a) Perfil renal normal; creatinina sérica <1,4 mg/dl; UP/C <0,5 b) creatinina sérica <1,4 mg/dl UP/C = 0,5-1	Alopurinol+ antimoniato de meglumina ou alopurinol+miltefosina	Bom a reservado
<b>Estádio III Doença grave</b>	Níveis de anticorpos positivos médios a altos	Cães com os sinais anteriores mais lesões derivadas a imunocomplexos, como vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite	Alterações clinicopatológicas do estágio II Insuficiência renal crónica (IRC) IRIS estágio I com UP/C> 1 ou estágio II (creatinina sérica 1,4-2 mg/dl)	Alopurinol+ antimoniato de meglumina ou alopurinol+miltefosina Seguir guias IRIS para IRC	Reservado a desfavorável
<b>Estádio IV Doença muito grave</b>	Níveis de anticorpos positivos médios a altos	Cães com os sinais anteriores mais tromboembolismo pulmonares, síndrome nefrótica e doença renal em estado final	Alterações clinicopatológicas do estágio II IRC IRIS estágio III (creatinina sérica 2-5 mg/dl) e estágio IV (creatinina sérica > 5 mg/dl) Síndrome nefrótico: Proteinúria marcada, UP/C> 5	Alopurinol Seguir guias IRIS para IRC	Desfavorável

### 1.7.1. Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes foram durante bastante tempo utilizados como os fármacos leishmanicida de primeira escolha no tratamento, quer de LCan quer de

leishmaniose humana. Estes, seletivamente, inibem as enzimas protozoárias responsáveis pela glicólise e oxidação dos ácidos gordos (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

O antimoniato de meglumina, de nome comercial Glucantime®, é o fármaco mais utilizado no tratamento de leishmaniose, sendo administrado por via subcutânea (SC), intramuscular (IM) ou endovenosa (IV), a uma dose de 75-100 mg/kg, SID ou 40-75 mg/kg, BID (Ramsey, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Pode causar celulite cutânea ou abscessos no sítio da injeção e possui uma ação nefrotóxica (Tassi *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012). O desenvolvimento de estirpes de *L. infantum* resistentes aos antimoniais pentavalentes foi reportado em vários países, como França, Espanha e Itália (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

### 1.7.2. Alopurinol

É um fármaco indispensável ao tratamento de LCan, utilizado, frequentemente, de forma isolada ou em combinação com outros fármacos, como por exemplo os antimoniais pentavalentes. É um composto hipoxantínico, metabolizado por *Leishmania*, com fim de se produzir um análogo da iosina. Este é incorporado no ARN leishmânico, causando falha na tradução proteica e inibição da replicação parasitária (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Quando usado de forma isolada, a dose utilizada é de 10 mg/kg, por via oral (PO), BID, no mínimo durante 6-12 meses (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Uma melhoria clínica, bem como a redução dos parasitas para números imperceptíveis, observam-se dentro de 4 semanas, no entanto, podem ocorrer recorrência após fim da terapia (Baneth e Solano-Gallego, 2012). A duração do tratamento depende da gravidade da doença, da resposta clínica e parasitológica, e da tolerância individual a este fármaco. Alguns cães são extremamente sensíveis, não permitindo a descontinuação do tratamento, enquanto outros são capazes de controlar a infecção sem a necessidade de um tratamento prolongado (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Durante o tratamento, a função renal pode deteriorar-se. Contudo, geralmente, surge uma resolução das lesões cutâneas e melhoria generalizada da condição clínica do paciente. Para além disso, o uso de alopurinol causa hiperxantinúria, podendo originar, ocasionalmente, urolitíase (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

A terapia, com este fármaco, pode ser descontinuada aquando:

- 1) da presença de uma recuperação completa, quer física, quer clinicopatológica, através de exame físico, hemograma, painel bioquímico e análise de urina.

2) da diminuição marcada dos níveis de anticorpos.

A terapia pode ser, também, interrompida quando não é possível controlar ou diminuir a xantínúria através de dietas pobres em purina ou pela redução da dose de alopurinol (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

### **1.7.3. Miltefosina**

A miltefosina, de nome comercial Milteforan®, é o mais recente fármaco estudado para o controlo da leishmaniose. Trata-se de um alquilfosfolípido com efeito tóxico direto sobre as leishmânias (Baneth e Solano-Gallego, 2012); possui uma ação antimetabólica e leishmanicida, induzindo uma alteração da biossíntese de glicolípidos e glicoproteínas na membrana do parasita (Miró e Moreno, 2006).

A miltefosina é administrada oralmente a uma dose de 2 mg/kg/dia durante 4 semanas, ou em combinação com alopurinol, sendo uma alternativa à combinação de antimionato de meglumina com alopurinol (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Os efeitos secundários descritos incluem alterações gastrointestinais, como vômitos, diarreia e anorexia (Miró e Moreno, 2006).

### **1.7.4. Combinação de antimoniato de meglumina e alopurinol**

O tratamento combinado de antimoniato de meglumina e alopurinol é considerado a terapêutica mais eficaz, constituindo o protocolo mais utilizado contra a leishmaniose. Esta combinação é administrada por 4-8 semanas, seguido de uma continuação do alopurinol, isoladamente, durante 6-12 meses (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

### **1.7.5. Combinação de miltefosina e alopurinol**

É uma alternativa à combinação anterior (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A miltefosina tem sido administrada a 2 mg/kg, PO, SID, durante 28 dias consecutivos, isoladamente ou combinada com alopurinol na dose de 10 mg/kg, PO, BID, durante vários meses. Os animais tratados com estes fármacos mostraram uma melhoria clínica progressiva após 1 mês do início da terapia, acompanhada com uma diminuição do título de anticorpos séricos anti-

*Leishmania* e da carga de ADN de *Leishmania* nos linfonodos. A miltefosina apresenta uma melhoria na sua eficácia clínica quando utilizada em conjunto com alopurinol (Oliva *et al.*, 2010).

#### **1.7.6. Anfotericina B**

A anfotericina B é um macrólido polieno utilizado como antifúngico, possuindo também atividade contra protozoários. Permite a cura clínica na maioria dos cães e é administrada endovenosamente (Oliva *et al.*, 2010). Liga-se ao ergosterol, alterando, assim, a permeabilidade da membrana celular, com posterior saída de iões, água e outras moléculas, levando por fim à morte celular por plasmólise. Contudo, este composto é bastante nefrotóxico, causando vasoconstrição renal, redução da taxa de filtração glomerular e, possivelmente, atuação direta nas células epiteliais renais (Miró *et al.*, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Para além disso, pode causar vômitos, febre, anorexia e periflebitas (Noli e Auxilia, 2005).

#### **1.7.7. Outras associações medicamentosas**

Outros fármacos têm sido descritos com eficácia anti-*Leishmania*, nomeadamente cetoconazole, pentamidina, aminosidina, metronidazol, espiramicina e marbofloxacina (Miró *et al.*, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Estes fármacos são considerados, atualmente, medicamentos de segunda linha, sendo necessário mais estudos clínicos para verificar a sua eficácia terapêutica (Miró *et al.*, 2008).

#### **1.7.8. Monitorização**

A monitorização dos parâmetros clinicopatológicos deve acontecer durante e um mês após o início do tratamento e, a partir daí, a cada 3-4 meses. Mais tarde, quando o cão estiver recuperado clinicamente, deve ser recomendada uma reavaliação a cada 6 meses ou uma vez por ano (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Se, após um ciclo de tratamento, o animal não evoluir favoravelmente, será necessário instituir um novo ciclo terapêutico com eventual mudança de fármaco ou dose aplicada (Miró e Moreno, 2006).

Os parâmetros a avaliar durante o tratamento dependem das alterações individuais de cada cão, mas em geral é aconselhado a realização de análises hematológicas, bioquímica sérica, sorologia, proteinograma e análise de urina com determinação do rácio UP/C (Miró e Moreno, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Em termos serológicos, alguns cães podem apresentar uma descida, muito significativa, dos níveis de anticorpos dentro de 6 meses ou 1 ano após o início do tratamento, enquanto outros apenas demonstram uma melhoria clínica. Em contrapartida, um aumento, marcado, dos níveis de anticorpos pode ser interpretado como recorrência ou recaída, sobretudo em cães após descontinuação do tratamento (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Para além disto, deve-se ter em conta a presença de doenças concomitantes (nomeadamente as parasitoses transmitidas por vetores ixodídeos) que possam impedir uma resposta eficaz, por parte do animal, ao tratamento aplicado (Miró e Moreno, 2006).

### **1.8. Controlo e profilaxia**

O controlo da LCan pode estar relacionado com o controlo da leishmaniose humana. Em termos veterinários o principal objetivo é o tratamento do cão como doente, enquanto no âmbito de saúde pública é a eliminação dos reservatórios. Qualquer medida implementada para controlar a progressão da doença deve implicar o desenvolvimento e aplicação de programas de controlo em áreas extensas de território, que incluam medidas contra os vetores e reservatórios, e medidas de proteção dos hospedeiros vertebrados (Martínez-Moreno *et al.*, 1999). Eutanasiar cães doentes e seropositivos é, na maior parte das vezes, inaceitável para os donos, mas é, também, ineficaz no controlo da dispersão da doença, devido à existência de infeção subclínica nos cães e à possibilidade de existirem outros reservatórios, fontes adicionais de transmissão parasitária. Para além disso, os métodos disponíveis para teste não identificam todos os cães infetados. Mais ainda, a população de cães jovens suscetíveis podem, sempre, substituir os animais eutanasiados (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Existe uma panóplia de medidas preventivas contra a picada do vetor. Estas incluem manter os cães dentro de casa durante o período sazonal dos vetores, sobretudo ao crepúsculo; reduzir os micro-habitats favoráveis para os vetores, como pilhas de madeira e pedra, na vizinhança da casa ou em outros locais onde o cão possa estar; utilizar inseticidas em locais fechados e produtos veterinários contendo piretróides, permetrina ou deltametrina (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Os inseticidas tópicos incluem soluções para unção punctiforme (“spot-

on”), “sprays” e coleiras (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Os “spot-ons” contendo permetrina ou imidaclopride estão recomendados a cada 3 semanas. Estes devem ser administrados, pelo menos, 2 dias antes de qualquer viagem. As coleiras impregnadas com deltametrina protegem durante 5-6 meses, fim do qual devem ser substituídas. Estas devem ser aplicadas, pelo menos 1-2 semanas antes de qualquer viagem (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Tanto os médicos veterinários como os donos são aconselhados a verificar as recomendações rotuladas nos diversos produtos e a seguir as instruções do fabricante, para assim aplicarem o produto de forma correta. Para além disso, a informação ao cliente sobre a manutenção adequada do inseticida ao longo do período de atividade do vetor é, também, crucial para a proteção de cães (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

As vacinas de frações purificadas de *Leishmania* aparentam ser eficazes. Estas são produzidas a partir de: uma glicoproteína, o ligante fucose-manose de *L. donovani* (Solano-Gallego *et al.*, 2011), no caso de Leishmune®; produzidas com tecnologia recombinante, tendo com imunogénio a proteína A<sub>2</sub>, no caso de LeishTec® (ambas disponíveis comercialmente no Brasil); ou a partir de proteínas secretadas/excretadas, caso de CaniLeish® na Europa.

Leishmune® é administrada num total de três doses, cada uma com um intervalo de 21 dias, sendo que durante este período, se o animal for picado por um vetor infetado poderá infetar-se. O adjuvante do imunogénio é a saponina que possui a propriedade de estimular a resposta imunitária celular e humoral simultaneamente, Th-1/Th-2. Esta vacina deve ser aplicada apenas em cães saudáveis e seronegativos para *Leishmania*, a partir dos 4 meses de idade. Um teste ELISA negativo não isenta a possibilidade do animal já se encontrar infetado, já que os testes sorológicos só possuem capacidade de detetar anticorpos anti-*Leishmania* de 1,5 a 4 meses após infeção. A imunidade é mantida anualmente, sendo que a revacinação deve ser efetuada um ano após a primeira dose. A resposta à vacinação está diretamente relacionada à competência imunológica de cada animal (Zoetis, 2005).

A outra vacina comercialmente disponível no Brasil (LeishTec) é uma vacina recombinante contra a LCan, não indicada para cães infetados, uma vez que não possui carácter imunoterápico. Esta vacina deverá ser aplicada apenas em cães com idade superior a 4 meses e após um minucioso exame clínico realizado pelo médico veterinário, e apenas em cães aparentemente saudáveis e com resultados sorológicos negativos. É administrada subcutaneamente, num total de 3 doses com intervalo de 21 dias entre cada aplicação, sendo

que o animal deverá apresentar resposta imunológica 21 dias após a terceira e última dose. A revacinação é anual, contando a partir da primeira dose. Em caso de atraso até 15 dias, deve-se administrar duas doses com intervalo de 21 dias entre as aplicações. Caso o atraso seja superior, deverá iniciar-se, novamente, todo o protocolo vacinal (Calier, 2010).

Na Europa, a vacina disponível comercialmente (CaniLeish®) é composta por proteínas secretadas/excretadas de *L. infantum* e o adjuvante é constituído por um extrato purificado de *Quillaja saponaria* (QA-21). A vacina é administrada num total de 3 doses intervaladas por 21 dias, SC, induzindo uma resposta imunitária celular caracterizada pela atividade dos Th-1 no período de 3 semanas após a primeira dose (Moreno *et al.*, 2012). É utilizada para a imunização ativa de cães negativos a *Leishmania* a partir dos 6 meses de idade, de forma a reduzir o risco de uma infeção ativa e de doença clínica, após contacto com a *L. infantum*. A segunda dose é administrada 3 semanas depois e a terceira 3 semanas após a segunda. A imunidade é mantida durante um ano, logo a revacinação deve ser efetuada anualmente para, assim, manter a estimulação imunitária no animal. Deve vacinar-se apenas os animais saudáveis e seronegativos, recomendando-se a desparasitação e a realização de um teste sorológico rápido ou outro para deteção do parasita antes da primeira injeção. Se o resultado for negativo a vacinação pode ser realizada. No caso de o título ser positivo alto a vacinação não é recomendável, mas se este for baixo positivo deverá ser realizado outro teste sorológico, 3 meses mais tarde, para confirmação. Se resultar um título negativo a vacinação poderá ser realizada, caso contrário o cão não deve ser vacinado. As reações adversas incluem reações locais moderadas e passageiras como tumefação, nódulos, dor à palpação ou eritema, hipertermia, apatia e alterações digestivas. A vacinação não invalida a aplicação de medidas destinadas a reduzir a exposição dos vetores (Virbac, 2011).

Atualmente existe um novo produto no combate à LCan, Leishguard®, cujo princípio ativo é a domperidona, que estimula a resposta imunitária celular, aumentando o potencial leishmanicida dos leucócitos fagocíticos, responsáveis finais pela eliminação dos parasitas. Em forma de suspensão, é administrado PO ou misturado com a comida, à dose 1 ml por cada 10 kg, SID, durante 4 semanas consecutivas. Vários ensaios clínicos controlados foram realizados em mais de 700 cães de mais de 20 raças diferentes, demonstrando que Leisguard® reduz drasticamente o risco de desenvolvimento da infeção e da doença em animais saudáveis submetidos a múltiplas exposições naturais ao parasita, incluindo em áreas altamente endémicas. Para além disso, em cães já infetados e seropositivos, Leisguard® reduz significativamente e em poucas semanas, quer o título de anticorpos contra *Leishmania* quer

os sinais clínicos indicadores da progressão da doença. As características deste fármaco permitem tanto prevenir como tratar a LCan em qualquer idade sem interferir com nenhum teste de diagnóstico, essencial para a deteção de cães infetados em fases iniciais da doença, nem com outras terapias concomitantes que o médico veterinário considere adequado aplicar (Homedes, 2011).

O uso futuro de uma abordagem de controlo integrado, combinando a vacinação com a aplicação de inseticidas tópicos, poderá reduzir a prevalência de infeção de cães em países endémicos e não endémicos (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

### **1.9. Prognóstico**

O prognóstico da LCan pode ser reservado, dependendo, essencialmente, da gravidade das lesões originadas no decorrer da infeção, do tempo decorrido até ao estabelecimento do diagnóstico, da resposta imunitária individual e, por fim, da progressão da doença. Se o animal não atingir um estado de insuficiência renal, o tratamento é, frequentemente, eficaz, melhorando quer as manifestações dérmicas, quer as manifestações viscerais da doença (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

## 2. CASOS CLÍNICOS

Neste capítulo serão descritos quatro casos clínicos dos 11 que acompanhei durante o meu período de estágio no HVBV e no HVTM, entre 3 de Setembro de 2012 e 30 de Abril de 2013.

O diagnóstico de leishmaniose nos cães apresentados na Tabela 2 foi efetuado através da utilização de testes sorológicos (IFAT e/ou ELISA) e/ou citologias aspirativas por agulha fina de medula óssea e/ou linfonodos.

**Tabela 2** - Casuística de casos observados durante o período de estágio.

<b>Nome</b>	<b>Raça</b>	<b>Manifestações clínicas principais</b>
Anteu	Dobermann	Nódulos cutâneos
Boogie	Indeterminada	Claudicação e caquexia
Messi	Labrador	Lesões cutâneas
Pandora	Labrador	Epistaxis
Panzer	Dogue Alemão	Proteinúria
Pelé	Pastor Alemão	Lesões cutâneas
Picasso	Dogue Alemão	Hematúria
Picasso	Indeterminada	Claudicação e caquexia
Picatchu	Indefinida	Hematúria
Plutão	Pug	Queratoconjuntivite seca
Scott	Indeterminada	Claudicação

## **2.1. Caso clínico nº 1**

### **2.1.1. Identificação do animal**

**Nome:** Scott

**Raça:** Indeterminada

**Data de nascimento:** 1 de Setembro de 2009

**Sexo:** Masculino (inteiro)

**Peso:** 19,5 kg

**HVTM**

### **2.1.2. Motivo da consulta**

Apresentou-se à consulta, no HVTM, queixoso do membro posterior esquerdo, não o apoiando.

### **2.1.3. História pregressa**

Desde há uma semana que se queixa do membro posterior esquerdo, não se descartando a hipótese de trauma. Encontrava-se devidamente vacinado, mas em termos de desparasitação a proprietária não soube dar qualquer informação. Visitou outro médico veterinário anteriormente, que o aconselhou fazer raio X, mas não lhe prescreveu qualquer terapêutica. O Scott continuou bem-disposto e com um apetite caprichoso.

### **2.1.4. Exame físico**

#### **2.1.4.1. Exame de estado geral**

O animal apresentava-se normal, com exceção de regiões de alopecia ao longo do corpo, feridas de decúbito e cauda de rato.

#### **2.1.4.2. Exame ortopédico**

No exame ortopédico foi possível observar o edemaciamento do joelho esquerdo quando comparado com o joelho direito e efusão articular, não tendo sido sentida qualquer crepitação. Durante o exame o Scott apresentou desconforto e dor, uma vez que não foi utilizada sedação devido aos custos que acarretariam.

### 2.1.5. Diagnósticos diferenciais

Segundo a histórica clínica e exame físico, instituíram-se os seguintes diagnósticos diferenciais: devido à claudicação, tumefação e efusão articular, considerou-se a existência de artrite inflamatória erosiva de natureza reumatóide, imunomediada ou séptica. Para além disto, foi considerado a hipótese de artrite inflamatória não erosiva por doença infecciosa, bem como rutura do ligamento cruzado anterior, trauma e/ou alterações ósseas.

### 2.1.6. Exames complementares

Tendo em conta os diversos diagnósticos diferenciais, deu-se seguimento aos seguintes exames complementares:

#### a) Perfil hematológico

**Tabela 3** - Hemograma do Scott. Os valores sublinhados encontram-se fora dos valores de referência. Hct: hematócrito; VCM: volume celular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; VPM: volume plaquetário médio

Análises	Resultado	Valores de referência	Unidades
<b>Hemograma completo</b>			
<b>Glóbulos Vermelhos</b>	6,52	5,5-8,5	m/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina	14,8	10,0-18,0	g/dl
Hct	45	35,0-55,0	%
VCM	69,1	58,0-73,0	fL
CHCM	32,8	28,0-40,0	g/dl
<b>Glóbulos Brancos</b>	<u>4,26</u>	6,0-17,0	m/mm <sup>3</sup>
Linfócitos	1,31	0,6-5,1	m/mm <sup>3</sup>
Monócitos	0,17	0,1-1,7	m/mm <sup>3</sup>
Granulócitos	<u>2,78</u>	3,0-13,6	m/mm <sup>3</sup>
Linfócitos (%)	30,9	10,0-30,0	%
Monócitos (%)	4,1	2,0-10,0	%
Granulócitos (%)	65,0	50,0-80,0	%
<b>Plaquetas</b>	269	120-600	m/mm <sup>3</sup>
VPM	8,8	5,0-12,0	fL

Devido à diminuição do número de glóbulos brancos, mais precisamente dos neutrófilos, foi identificada uma leucopenia por neutropenia.

b) Bioquímica sérica

**Tabela 4** - Bioquímica sérica do Scott. Os valores sublinhados encontram-se fora dos valores de referência. ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato transaminase; ALP: fosfatase alcalina; GGT: gama glutamil transferase

Análises	Resultado	Valores de referência	Unidades
<b>Bioquímica sérica</b>			
ALT	26	2-50	U/L
AST	20	5-40	U/L
ALP	68	<130	U/L
GGT	1	<6	U/L
Albumina	3,45	2,5-5,6	g/dl
Proteínas totais	6,73	5,3-8,0	g/dl
Bilirrubina	0,19	0,1-0,6	mg/dl
Colesterol	285	108-300	mg/dl
Triglicéridos	53	20-112	mg/dl
Creatinina	0,81	0-1,4	mg/dl
Ureia	47	10-76	mg/dl
Fósforo	4,05	2,4-6,1	mg/dl
Cálcio	10,50	8,0-12,2	mg/dl
Glicose	<u>132,8</u>	54-100	mg/dl

c) Análise de urina

**Tabela 5** - Análise de urina do Scott. pH: potencial de hidrogénio

Análises	Resultado
<b>Análise de urina</b>	
Aspeto	Normal
pH	N
Densidade	1.026
Proteínas	+++
Glicose	-
Corpos cetónicos	-
Bilirrubina	-
Urobilinogénio	-
Hemoglobina	-

d) Raio-X

Foi realizada radiografia da articulação afetada em duas projeções, uma com o membro em posição neutra (Fig. 14) e outra em máxima compressão (Fig. 15).



**Figura 14** - Radiografia do joelho esquerdo em posição neutra (imagem gentilmente cedida pelo HVTM).



**Figura 15** - Radiografia do joelho esquerdo em compressão (imagem gentilmente cedida pelo HVTM).

Observou-se uma compressão e avanço da gordura infrapatelar e deslocamento dos planos fasciais caudalmente, o que nos remete para efusão/derrame articular.

e) Artrocentese

Foi retirado aproximadamente 8 ml de sangue, com diminuição da viscosidade à análise macroscópica, sugerindo causa traumática.

f) Serologia

**Tabela 6** - Resultado LeisScan®, teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. Rz: razão

<b>Razão</b>	<b>Resultado</b>	<b>Equivalência IFAT</b>
<b>Rz &gt; 4</b>	Positivo muito alto	>1280

### **2.1.7. Tratamento**

Foi para casa com anti-inflamatório não esteróide (AINE), Robenacoxib (Onsior®, 1-2 mg/kg), PO, SID, durante 7 dias consecutivos, enquanto se aguardou pelo resultado das análises, recomendando-se o retorno ao hospital passado uma semana.

### **2.1.8. Diagnóstico**

LCan com artrite erosiva secundária a leishmaniose.

### **2.1.9. Acompanhamento do animal**

O Scott retornou ao HVTM passado uma semana. Encontrava-se mais magro, com 18,5 kg, e o joelho esquerdo permanecia edemaciado. Devido ao resultado da serologia, LeisScan®, teste ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, iniciou-se o tratamento para leishmaniose.

**Tabela 7** - Análise das proteínas e creatinina urinárias, e rácio UP/C do Scott.

<b>Análises</b>	<b>Resultado</b>	<b>Valores de referência</b>	<b>Unidades</b>
<b>Bioquímica sérica</b>			
Urina - Proteínas	299,5		mg/dl
Urina - Creatinina	79,26		mg/dl
Urina – Ratio P/C	3,78	<5,0	

**Tabela 8** - Análise de urina do Scott.

<b>Análises</b>	<b>Resultado</b>
<b>Análise de urina</b>	
Aspeto	Normal
pH	N
Densidade	1.028
Proteínas	+++
Glicose	-
Corpos cetónicos	-
Bilirrubina	-
Urobilinogénio	-
Hemoglobina	Sangue (cistocentese)

Aplicou-se o seguinte tratamento: administração SC de antimoniato de meglumina (Glucantime®, 75-100 mg/kg), SID, durante 30 dias consecutivos; administração PO de alopurinol (Alopurinol - ratiopharm®, 10 mg/kg), BID, durante 6 meses; administração PO de enrofloxacin (Baytril®, 5 mg/kg), SID, durante 8 dias consecutivos; administração PO de uma saqueta de sucralfato, 30 minutos antes de cada refeição, durante o tratamento com prednisolona; administração PO de prednisolona (Lepicortinolo®, 0,5 mg/kg), BID, durante 7 dias consecutivos;

Desabituação: administração PO de metade da dose inicial, BID, durante 2 dias consecutivos; administração PO de ¼ da dose inicial, BID, durante 2 dias consecutivos; administração PO de ¼ da dose inicial, SID, durante 2 dias consecutivos; administração PO de ¼ da dose inicial, após 48 horas da última toma.

Na reavaliação após 15 dias o Scott apresentou-se bem-disposto. Apesar de comer bastante bem, mantinha o mesmo peso, tendo sido aconselhada uma ração seca de melhor qualidade, bastante palatável, para aumentar o peso e mantê-lo ideal, e proporcionar uma boa digestão (Royal Canin® Medium Adult), uma vez que comia uma ração de marca branca. Em termos ortopédicos apoiava corretamente o membro, não mostrando qualquer manifestação de dor. Foram realizadas novas provas analíticas que se encontravam dentro dos valores de referência.

No controlo seguinte, 1 mês após o anterior, o animal encontrava-se bem-disposto e com uma condição corporal superior. Tendo terminado o antimoníato de meglumina, foi iniciado tratamento PO com domperidona (Leishguard®, 1 ml/10kg), SID, durante 4 semanas consecutivas.

## 2.2. Caso clínico nº 2

### 2.2.1. Identificação do animal

**Nome:** Messi

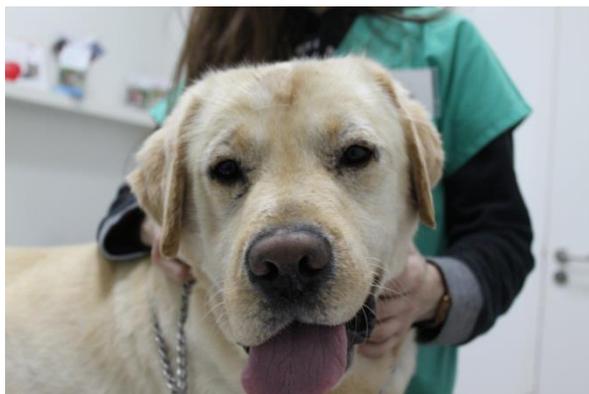
**Raça:** Labrador retriever

**Data de nascimento:** 8 de Maio de 2006

**Sexo:** Masculino (inteiro)

**Peso:** 28,0 kg

**HVBV**



**Figura 16** – Messi aquando a primeira consulta (fotografia gentilmente cedida pelo HVBV).

### 2.2.2. Motivo da consulta

Alopecia em várias regiões do corpo e claudicação intermitente dos membros posteriores.

### 2.2.3. História pregressa

Este animal residia em Guimarães, numa vivenda com acesso a jardim, juntamente com outros cães da mesma raça. Estava corretamente vacinado e desparasitado, não tendo acesso a resíduos nem a tóxicos. A sua alimentação consistia em ração comercial de qualidade superior e tinha livre acesso a água limpa e fresca.

Desde há 6 meses, aproximadamente, que o proprietário observava perdas de pêlo no focinho e nos membros. Na altura, o Messi foi consultado numa clínica veterinária local, sendo-lhe prescrito um antibiótico (Cefradina) e AINE, durante 15 dias consecutivos. As lesões, segundo o proprietário, apresentaram melhorias. No entanto, nunca chegaram a desaparecer. Três meses depois, o Messi realizou o mesmo tratamento e, novamente, este não produziu cura.

O Messi apresentou-se à consulta no HVBV porque as suas lesões não pruriginosas progrediram ao longo do tempo, tornando-se maiores, e há 3 semanas que demonstrava uma claudicação marcada dos membros posteriores sempre que alternava de posição de decúbito para estação. Os proprietários e restantes animais não apresentavam qualquer lesão cutânea e o animal não apresentava qualquer alteração de odor na pele.

## 2.2.4. Exame físico

### 2.2.4.1. Exame de estado geral

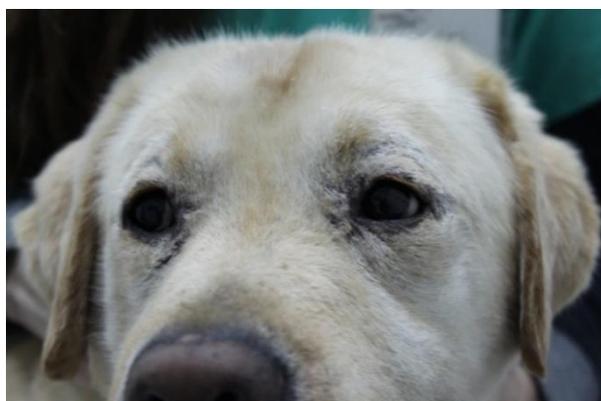
Ao exame de estado geral observou-se uma linfadenomegalia generalizada, sendo que os restantes parâmetros não apresentavam qualquer alteração.

### 2.2.4.2. Exame dermatológico

Efetuuou-se um exame dermatológico cujo resultados são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9** - Exame dermatológico do Messi.

<b>Exame à distância</b>	Pelagem sem brilho; zonas de hipotricose difusa na região da cabeça (focinho, pavilhão auricular, região periocular e nuca (Fig.17)); zonas de hipotricose localizada, nas áreas interdigitais, cotovelo direito e membros; onicogribose (Fig. 18).
<b>Prova de arrancamento do pêlo</b>	Depilação facilitada nas áreas supracitadas.
<b>Espessura da pele e elasticidade</b>	Pele espessada com diminuição da sua elasticidade.
<b>Áreas-alvo</b>	Certo grau de descamação e hiperpigmentação.



**Figura 17** – Pelagem sem brilho. Hipotricose difusa em torno dos olhos (fotografia gentilmente cedida pelo HVBV).



**Figura 18** – Hipotricose localizada no membro anterior direito. Onicogribose (fotografia gentilmente cedida pelo HVBV).

### 2.2.4.3. Exame ortopédico

Apresentou claudicação dos membros posteriores após algum tempo de exercício e dor aquando a manipulação das articulações coxofemoral e do joelho.

### 2.2.5. Diagnósticos diferenciais

Segundo a histórica clínica, sintomatologia e exame físico, instituíram-se os seguintes diagnósticos diferenciais: como causa de lesões de pele doenças imunomediadas (lupus eritematoso sistémico/discóide), demodicose, foliculite bacteriana, dermatofitose, endocrinopatias (hipotireoidismo, hiperadrenocorticismos,) eflúvios telógeno/anágeno, distrofias foliculares. Tendo em conta a presença de linfadenopatia considerou-se a presença de doenças infecciosas generalizadas de carácter bacteriano, fúngico, parasitário, viral, e mesmo a presença de neoplasias.

### 2.2.6. Exames complementares

Tendo em conta os diversos diagnósticos diferenciais, deu-se seguimento aos seguintes exames complementares:

- a) Tricograma

**Tabela 10** - Tricograma

	<b>Resultado</b>
<b>Tricograma</b>	Pontas intactas

Este exame foi realizado para evidenciar se existia prurido, infeção fúngica e defeitos na pigmentação, e avaliar a fase de crescimento do pêlo. O resultado remeteu-nos para lesões não pruríticas.

- b) Raspagem

**Tabela 11** - Raspagem

	<b>Resultado</b>
<b>Raspagem profunda</b>	Negativa

Este exame foi realizado para averiguar de algum tipo de infeção parasitária da pele, como o caso da infestação pela espécie *Demodex canis*.

c) Perfil hematológico

**Tabela 12** - Hemograma do Messi. Os valores sublinhados encontram-se fora dos valores de referência.

<b>Análises</b>	<b>Resultado</b>	<b>Valores de referência</b>	<b>Unidades</b>
<b>Hemograma completo</b>			
<b>Glóbulos Vermelhos</b>	6,2	5,5-8,5	m/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina	11,6	10,0-18,0	g/dl
Hct	45,0	37,0-55,0	%
VCM	68,1	60,0-77,0	fL
CHCM	34,2	30,0-37,5	g/dl
<b>Glóbulos Brancos</b>	13,5	5,50-17,0	m/mm <sup>3</sup>
Neutrófilos	8,00	2,00-12,00	m/mm <sup>3</sup>
Linfócitos	3,1	0,50-4,90	m/mm <sup>3</sup>
Monócitos	1,50	0,30-2,00	m/mm <sup>3</sup>
Eosinófilos	0,30	0,10-1,49	m/mm <sup>3</sup>
Basófilos	0,03	0,00-0,10	
Neutrófilos (%)	59,6		%
Linfócitos (%)	23,3		%
Monócitos (%)	15,0		%
Eosinófilos	1,9		%
Basófilos	0,2		%
<b>Plaquetas</b>	345	175-500	m/mm <sup>3</sup>
VPM	8,47	5,0-12,0	fL

d) Bioquímica sérica

**Tabela 13** - Bioquímica sérica do Messi. Os valores sublinhados encontram-se fora dos valores de referência.

<b>Análises</b>	<b>Resultado</b>	<b>Valores de referência</b>	<b>Unidades</b>
<b>Bioquímica sérica</b>			
ALP	47	47-254	U/L
Albumina	2,6	2,6-4,0	g/dl
Proteínas totais	<u>8,6</u>	5,0-7,2	g/dl
Creatinina	0,6	0,4-1,4	mg/dl
Ureia	15,6	9,2-29,2	mg/dl
Glicose	117	75-128	mg/dl
Cálcio	11	9,3-12,1	mg/dl
Colesterol Total	287	111-312	mg/dl

Devido ao aumento do valor das proteínas totais identificou-se hiperproteinemia sérica.

e) Análise de urina

**Tabela 14** - Análise de urina do Messi.

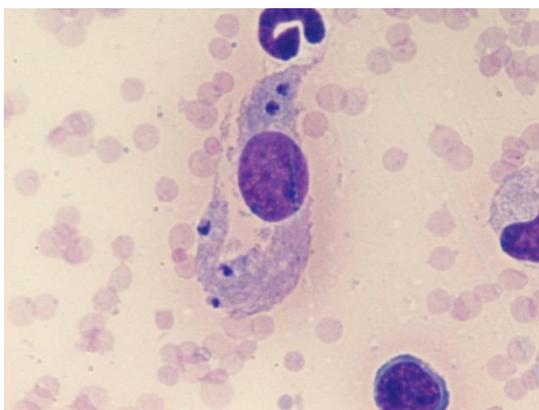
<b>Análises</b>	<b>Resultado</b>
<b>Análise de urina</b>	
Aspeto	Amarelo
pH	N
Densidade	>1,040
Leucócitos	-
Proteínas	++
Glicose	-
Corpos cetónicos	-
Bilirrubina	-
Urobilinogénio	-
Hemoglobina	-
Cristais	-

f) Teste rápido

Utilizou-se um teste imunocromatográfico, qualitativo, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* (Speed Leish K®), sendo o resultado positivo.

g) Citologia

Foi realizada uma punção de medula óssea, Posteriormente, fez-se a avaliação citológica utilizando esfregaços em lâmina corados por Giemsa, observados ao microscópico ótico nas ampliações de x400 e x1000 vezes.



**Figura 19** – Citologia de medula óssea (Fotografia gentilmente cedida pelo HVBV).

Presença de amastigotas de *Leishmania* no interior dos macrófagos.

h) Serologia

**Tabela 15** - Resultado da serologia (ELISA).

Análises	Resultado	Valores de referência
Anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	5,27	<0,90 – negativo
Anticorpos anti- <i>Ehrlichia</i>	0,06	0,90<índice<1,10 – duvidoso ≥1,10 - positivo

### i) Proteinograma

**Tabela 16** - Proteinograma do Messi. Os valores sublinhados encontram-se fora dos valores de referência. Index: índice; Band: banda; Rel.Area: área relativa; Con: concentração

Index	Band	Rel,Area	Conc (g/dl)	Intervalo (g/dl)
1	Albumina	24,94%	<u>1,82</u>	2,20-3,50
2	Alfa 1	3,74%	<u>0,27</u>	0,50-0,80
3	Alfa 2	15,75%	<u>1,15</u>	0,50-0,80
4	Beta 1	12,21%	0,89	0,50-1,10
5	Beta 2	13,18%	<u>0,96</u>	0,30-0,70
6	Gama	30,20%	<u>2,20</u>	0,50-1,80

PT: 5,50 – 7,50 A/G: 0,50 – 1,20

Presença de hipoalbuminemia e hiperglobulinemia policlonal  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$  e  $\gamma$ . Diminuição do rácio A/G (0,33).

#### 2.2.7. Diagnóstico

Leishmaniose com manifestações viscerais e cutâneas.

#### 2.2.8. Tratamento

Aplicou-se o seguinte tratamento: administração PO de alopurinol (Alopurinol - ratiopharm®, 10 mg/kg), BID, durante 6 meses; administração PO de miltefosina (Milteforan®, 2 mg/kg), SID, durante 28 dias consecutivos; administração PO de cefradina (Cefradur®, 20 mg/kg), BID; aplicação dermatológica de digluconato de clorexidina (Vetriderm® Clorexidina).

#### 2.2.9. Acompanhamento do animal

Na consulta de reavaliação, passados 30 dias, as lesões de pele encontravam-se com sinais de regressão e os proprietários reportaram o desaparecimento da claudicação. O tratamento com a miltefosina foi terminado, mantendo-se o alopurinol.

## 2.3. Caso clínico nº 3

### 2.3.1. Identificação do animal

**Nome:** Plutão

**Raça:** Pug

**Data de nascimento:** 4 de Abril de 2004

**Sexo:** Masculino (inteiro)

**Peso:** 8,900 kg

**HVBV**



**Figura 20** – Plutão aquando a primeira consulta (fotografia gentilmente cedida pelo Dr. Hugo Vilhena, HVBV).

### 2.3.2. Motivo da consulta

Apresentou-se à consulta, no HVBV, com uma opacidade branca na córnea.

### 2.3.3. História pregressa

Proprietários referiram o início da opacidade há dois dias atrás. Encontrava-se devidamente vacinado e desparasitado e, até este episódio, foi sempre um animal saudável.

### 2.3.4. Exame físico

#### 2.3.4.1. Exame de estado geral

No exame de estado geral o animal não apresentava qualquer alteração.

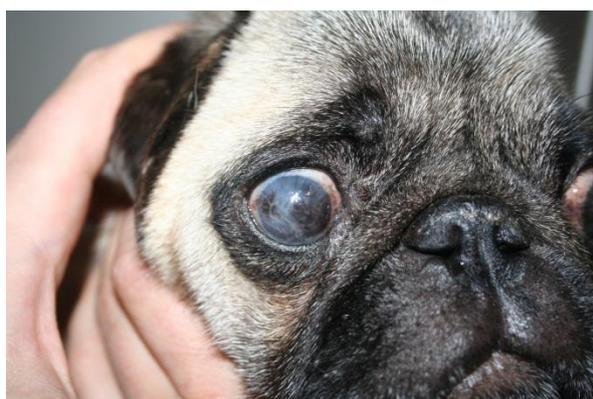
#### 2.3.4.2. Exame oftalmológico

Efetou-se um exame oftalmológico, cujos resultados são apresentados na Tabela 17.

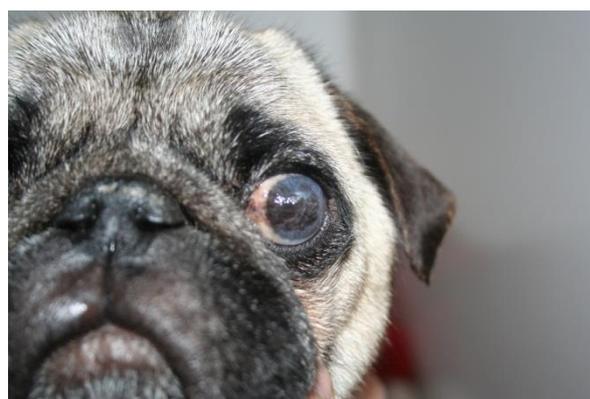
**Tabela 17** - Exame oftalmológico do Plutão.

	<b>Olho direito (OD)</b>	<b>Olho esquerdo (OS)</b>
<b>Testes visuais: teste de ameaça, prova de obstáculos e prova da bola de algodão</b>	Ausentes	Ausentes
<b>Órbita e globo ocular</b>	Exoftalmia e lagoftalmia ligeiras (características da raça), sinais de desconforto ocular – blefarospasmo, fotofobia, prurido ocular.	Exoftalmia e lagoftalmia ligeiras (características da raça), sinais de desconforto ocular – blefarospasmo, fotofobia, prurido ocular.

<b>Teste de Schirmer</b>	8 mm/min	6 mm/min
<b>Reflexos oculares: reflexo palpebral e reflexos pupilares direto e consensual</b>	Reflexo palpebral normal; reflexos pupilares não avaliáveis devido à opacidade corneal	Reflexo palpebral normal; reflexos pupilares não avaliáveis devido à opacidade corneal
<b>Anexos oculares: pálpebras, conjuntiva, membrana nictitante e aparelho lacrimal</b>	Corrimento ocular mucopurulento, hiperemia conjuntival ligeira (Fig. 21)	Corrimento ocular mucopurulento, hiperemia conjuntival ligeira (Fig. 22)
<b>Segmento anterior: esclera, córnea, câmara anterior e íris</b>	Hiperpigmentação e edema difuso da córnea, opacidade total da córnea; câmara anterior e íris não observáveis.	Hiperpigmentação e edema difuso da córnea, opacidade total da córnea; câmara anterior e íris não observáveis.
<b>Pressão intraocular</b>	16 mm/Hg	18 mm/Hg
<b>Segmento posterior: câmara posterior, cristalino, corpo vítreo e fundo do olho</b>	Não visualizável	Não visualizável
<b>Teste de fluoresceína</b>	Negativo	Negativo



**Figura 21** – Olho direito com exoftalmia ligeira (característico da raça); corrimento ocular mucopurulento; hiperemia conjuntival ligeira e hiperpigmentação da córnea (fotografia gentilmente cedida pelo Dr. Hugo Vilhena, HVBV).



**Figura 22** – Olho esquerdo com exoftalmia ligeira (característico da raça); corrimento ocular mucopurulento; hiperemia conjuntival ligeira e hiperpigmentação da córnea (fotografia gentilmente cedida pelo Dr. Hugo Vilhena, HVBV).

### **2.3.5. Diagnóstico**

Queratoconjuntive seca com hiperpigmentação corneal.

### **2.3.6. Tratamento**

Foi proposto fazer outros exames para despiste de certas doenças que provocam lesões oculares, mas por razões económicas os donos do Plutão recusaram. Sendo assim, aplicou-se o seguinte tratamento: administração tópica de 1 gota de flurbiprofeno sódico (Edolfene®), AINE, nos dois olhos, BID; aplicação tópica de 1 gota de um gel de lágrimas artificiais (Liposic®), em ambos os olhos, QID; aplicação tópica de 1 gota de ciclosporina A (Optimmune®), imunossupressor, em ambos os olhos, de BID. Ponderou-se tarsorrafia lateral e medial bilateral ou transplante de córnea.

Passados 2 meses o Plutão regressou ao HVBV:

### **2.3.7. Motivo da consulta**

O Plutão apresentava falta de apetite, cansaço, tosse e fezes muito escuras. O peso era de 8 kg.

### **2.3.8. Atualização clínica**

Desde a última consulta que os proprietários notaram que o Plutão se cansava mais facilmente, que as fezes apresentam uma aparência muito escura e que tinha vindo a perder peso de uma forma acentuada.

Ao longo desses 2 meses deu entrada na Clínica Veterinária da Marinha Grande com um Hct de 12%, sendo efetuada uma transfusão sanguínea de urgência. Realizou análises, observando-se um comprometimento renal, com o aumento da creatinina, ureia e fósforo inorgânico, e uma diminuição da albumina. Melhorou com marbofloxacina (Marbocyl®, 2 mg/kg) prescrita. Após um resultado duvidoso com teste imunocromatográfico, qualitativo, para deteção de anticorpos anti-*Ehrlichia* (*Ehrlichia* witness®), instituíram-lhe doxiciclina (Actidox®, 10 mg/kg). Contudo, apesar de alguma melhoria, os olhos permaneciam sem grandes alterações. Apresentou-se cansado, com pu/pd, tosse e dispneia. Pela segunda vez piorou drasticamente, entrando de urgência na Clínica Veterinária da Marinha Grande, com um Hct de 25% e com valores renais de novo aumentados (ureia, creatinina e fósforo inorgânico). No dia seguinte, foi referenciado para o Hospital Veterinário do Porto, com o Hct ainda mais baixo (18%), valores aumentados de ALT, ureia e proteínas totais (PTs > 11), e

presença de sangue (+++) na urina, A terapêutica efetuada foi a seguinte: solução vitamínica (Duphalyte®) e protetor hepático (Ornipural®).

### 2.3.9. Re-exame físico

#### 2.3.9.1. Re-exame de estado geral

No exame de estado geral, apesar de uma temperatura rectal normal, o termómetro possuía vestígios de sangue. Apresentava mucosas pálidas, dispneia, caquexia e desidratação, Sem dor abdominal à palpação.

### 2.3.10. Diagnósticos diferenciais

Segundo a histórica clínica e exame físico, instituíram-se os seguintes diagnósticos diferenciais: *diabetes mellitus*, *diabetes insipidus*, hiperadrenocorticismo, hipertiroidismo, hipo-adrenocorticismo, glomerulonefrite, pielonefrite, insuficiência renal crónica/aguda, hipercalcemia, hipocalcemia e doença hepática para causas de pu/pd; doenças infecciosas generalizadas de carácter bacteriano, fúngico, parasitário ou viral, e presença de neoplasia metastática ou neoplasia hematopoiética primária, tendo em conta os sinais sistémicos;

### 2.3.11. Exames complementares

Tendo em conta os diversos diagnósticos diferenciais, deu-se seguimento aos seguintes exames complementares:

#### a) Perfil hematológico

**Tabela 18** - Hemograma do Plutão. Os valores sublinhados encontram-se fora de valores referência.

Análises	Resultado	Valores de referência	Unidades
<b>Hemograma completo</b>			
<b>Glóbulos Vermelhos</b>	<u>2,56</u>	5,5-8,5	m/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina	<u>7,2</u>	10,0-18,0	g/dl
Hct	<u>17,4</u>	37,0-55,0	%
VCM	68,1	60,0-77,0	fL
CHCM	-	-	g/dl
<b>Glóbulos Brancos</b>	8,56	5,50-17,0	m/mm <sup>3</sup>

Neutrófilos	4,55	2,00-12,00	m/mm <sup>3</sup>
Linfócitos	1,92	0,50-4,90	m/mm <sup>3</sup>
Monócitos	1,50	0,30-2,00	m/mm <sup>3</sup>
Eosinófilos	0,53	0,10-1,49	m/mm <sup>3</sup>
Basófilos	0,06	0,00-0,10	
Neutrófilos (%)	53,1		%
Linfócitos (%)	22,5		%
Monócitos (%)	17,6		%
Eosinófilos	6,2		%
Basófilos	0,7		%
<b>Plaquetas</b>	282	175-500	m/mm <sup>3</sup>
VPM	9,84	5,0-12,0	fL

Devido à diminuição dos valores do número dos glóbulos vermelhos, hemoglobina e hematócrito identificou-se uma anemia. Como o valor do VCM se encontra dentro dos limites de referência, esta anemia foi considerada normocítica.

b) Outras provas

Gota fresca – negativo para microfilárias.

Auto-aglutinação em lâmina – negativo, caso contrário existiria “rouleaux”, hemácias empilhadas ou aderidas, formando uma fila, ou formação de aglutinados.

Lâmina - Observaram-se células policromatóflicas (+++), vários eritroblastos, ligeira anisocitose e policromasia.

c) Ecografia abdominal

O Plutão, em termos ecográficos, apresentava: bexiga distendida sem outras alterações, rins com ecogenicidade diminuída, sendo que o rim esquerdo possuía uma alteração da diferenciação córtico-medular; estômago em roseta muito exuberante com pregas da mucosa muito evidente; próstata com ligeira assimetria; fígado com ecogenicidade normal, observando-se 2 vasos de grandes calibres compatíveis com a veia cava caudal e a veia porta; baço com ecogenicidade diminuída, apresentando um parênquima heterogêneo em toda a sua extensão; adrenais sem alterações; presença de fezes e gás no cólon.

d) Bioquímica sérica

**Tabela 19** - Bioquímica sérica do Plutão. Os valores sublinhados encontram-se fora dos valores referência.

Análises	Resultado	Valores de referência	Unidades
<b>Bioquímica sérica</b>			
Creatinina	<u>1,80</u>	0,5-1,6	mg/dl
Proteínas totais	>12		g/dl

Devido ao aumento do valor das proteínas totais identificou-se uma hiperproteinemia sérica.

e) Serologia

**Tabela 20** - Resultado da serologia (ELISA).

Análises	Resultado	Valores de referência
Anticorpos anti- <i>Ehrlichia</i>	0,09	<0,90 – negativo 0,90<Índice <1,10 – duvidoso ≥1,10 - positivo

f) Proteinograma

**Tabela 21** - Proteinograma do Plutão. Os valores sublinhados encontram-se fora dos valores de referência.

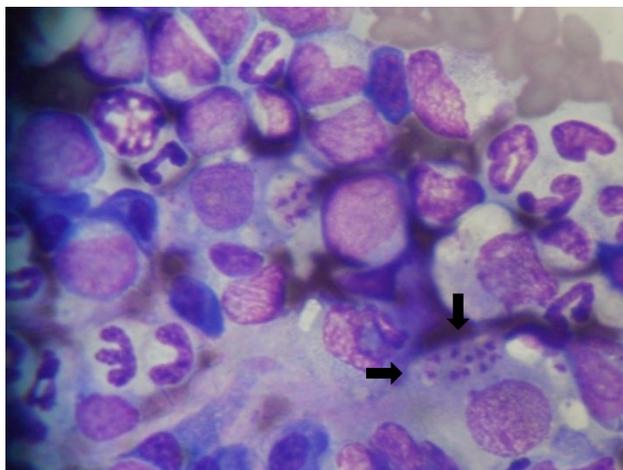
Index	Band	Rel,Area	Conc (g/dl)	Intervalo (g/dl)
1	Albumina	16,42%	2,55	2,20-3,50
2	Alfa 1	2,55%	<u>0,39</u>	0,50-0,80
3	Alfa 2	7,56%	<u>1,17</u>	0,50-0,80
4	Beta	24,14%	<u>3,74</u>	0,30-1,10
5	Gama	49,33%	<u>7,65</u>	0,50-1,80

**PT: 5,50 – 7,50 A/G: 0,73 – 1,49**

Presença de hiperproteinemia sérica com hiperglobulinemia policlonal  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .  
Diminuição do rácio A/G (0,20).

### g) Citologia

Foi realizada uma punção de medula óssea. Posteriormente, fez-se a avaliação citológica utilizando esfregaços em lâmina corados por Giemsa, observados ao microscópio óptico nas ampliações de x400 e x1000.



**Figura 23** – Citologia de medula óssea (fotografia de André Vieira).

Presença de amastigotas de *Leishmania* no interior dos macrófagos.

### h) Exame oftalmológico

Efetuuou-se o teste de Schirmer para reavaliar a produção lacrimal, apresentando 2 mm/min em ambos os olhos. Para além disso, apresentava uma hiperpigmentação corneal bilateral de aproximadamente 100%, impossibilitando a observação do segmento posterior, mais concretamente da câmara posterior, cristalino, corpo vítreo e fundo do olho.

### 2.3.12. Diagnóstico

LCan com manifestações oculares.

### 2.3.13. Tratamento e evolução

Colocou-se o Plutão a receber fluídos, tendo extremo cuidado com as vasculites que facilmente efetuava, juntando a taxa de hidratação, e introduziu-se uma alimentação adequada. O tratamento incluiu ainda a administração PO de sucralfato (Sucralfato® generis suspensão oral, 500 mg/cão), antes das refeições, servindo como antiácido, anti ulceroso, e protetor da mucosa, a administração subcutânea de ranitidina (Zantac®, 2 mg/kg), BID,

antiácido, anti ulceroso e antagonista dos recetores H<sub>2</sub>, e administração PO de alopurinol (Alopurinol - ratiopharm®, 10 mg/kg), BID.

Após 4 dias de tratamento o animal apresenta algumas melhorias relativas à sintomatologia aquando a consulta. Não se apresentava dispneico e encontrava-se bem hidratado e com apetite voraz, apesar dos valores renais se encontrarem elevados (ureia 64,7 mg/dl, creatinina 1,7 mg/dl).

Teve alta com a seguinte terapêutica: administração PO de sucralfato, antes das refeições; administração PO de ranitidina, BID; administração PO de alopurinol, BID; aplicação tópica de 1 gota de ciclosporina A, em ambos os olhos, BID, *ad eternum*; aplicação de coleira antiparasitária (Scalibor®, 48 cm); ração renal (Hill's k/d) seca e húmida. Reavaliação marcada daí a 15 dias para controlar hemograma, proteinograma e bioquímica renal com fósforo.

#### **2.3.14. Acompanhamento do animal**

No controlo os proprietários referiram que o Plutão comeu bife de peru grelhado nos primeiros dias, uma vez que não quis a ração indicada. Depois começou a comer bastante melhor, ganhando algum peso. Notaram que pu/pd se encontrava a diminuir. Em relação aos olhos, estes não apresentavam alterações.

Em termos hematológicos o Plutão apresentava um hematócrito baixo (22%), uma anemia macrocítica normocrómica e uma leucocitose por monocitose, Em termos bioquímicos observou-se um aumento da ALP e uma hipoalbuminemia. Em termos renais, a creatinina e a ureia encontravam-se normal. No proteinograma observou-se uma hiperproteinemia sérica com hipoalbuminemia e hiperglobulinemia policlonal  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo o rácio A/G de 0,47. O título de anticorpos anti-*Leishmania* foi de 320 (IFAT).

O Plutão não voltou a comparecer no HVBV, não tendo assim mais dados relativos à sua evolução.

## 2.4. Caso clínico nº 4

### 2.4.1. Identificação do animal

**Nome:** Panzer

**Raça:** Dogue alemão

**Data de nascimento:** 21 de Maio de 2009

**Sexo:** Masculino (inteiro)

**Peso:** 61 kg

**HVBV**



**Figura 24** – Panzer aquando a primeira consulta (fotografia gentilmente cedida pelo Dr. Hugo Vilhena, HVBV).

### 2.4.2. Motivo da consulta

Apresentou-se à consulta com hiporexia, debilidade muscular e emagrecimento acentuado.

### 2.4.3. História pregressa

O Panzer encontra-se devidamente vacinado e desparasitado, História clínica pregressa de pioderma, manifestada com lesões nas virilhas e axilas, tratada com amoxicilina + ácido clavulânico (Amoxicilina+Ácido clavulânico - ratiopharm®), aceponato de hidrocortisona (Cortavance®), corticosteroide de aplicação tópica, e selamectina (Stronghold®), e história de quemose e conjuntivite por entropion no olho direito, tratado com flurbiprofeno sódico (Edolfene®), colírio de cloranfenicol (Clorocil®), antibiótico, meloxicam (Metacam®), AINE, e pontos de fixação.

Começou a apresentar os sinais aproximadamente há 1 semana, acentuando-se os mesmos há 2 dias. Apresentava fezes normais, possuindo, por vezes, uma consistência mais líquida. Costumava brincar com panos.

### 2.4.4. Exame físico

#### 2.4.4.1. Exame de estado geral

No exame de estado geral apresentou uma temperatura elevada (39,7° C). Encontrava-se desidratado, com um prolongamento no tempo de anulação da prega de pele, com uma baixa condição corporal e com dor à palpação abdominal.

#### 2.4.4.2. Exame ortopédico

O Panzer apresentava dor ao movimento, sobretudo nos membros posteriores, e relutância no movimento da cabeça.

#### 2.4.5. Diagnósticos diferenciais

Segundo a história clínica e exame físico, consideraram-se os seguintes diagnósticos diferenciais: doenças infecciosas generalizadas de carácter bacteriano, fúngico, parasitário ou viral, tendo em conta a temperatura aumentada. Presença de corpo estranho abdominal, ulceração gástrica ou duodenal, intusceção, volvo intestinal, doença hepatobiliar, pancreatite, parasitoses intestinais devido à baixa condição corporal e dor à palpação abdominal. Insuficiência renal, ingestão insuficiente de água, vômito e diarreia foram considerados para a desidratação avaliada.

#### 2.4.6. Exames complementares

Tendo em conta os diversos diagnósticos diferenciais, deu-se seguimento aos seguintes exames complementares:

- a) Perfil hematológico

**Tabela 22** - Hemograma do Panzer. Os valores sublinhados encontram-se fora dos valores de referência.

Análises	Resultado	Valores de referência	Unidades
<b>Hemograma completo</b>			
<b>Glóbulos Vermelhos</b>	5,98	5,5-8,5	m/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina	14,8	10,0-18,0	g/dl
Hct	46,9	37,0-55,0	%
VCM	<u>78,5</u>	60,0-77,0	fL
CHCM	31,5	30,0-37,5	g/dl
<b>Glóbulos Brancos</b>	11,20	5,50-17,0	m/mm <sup>3</sup>
Neutrófilos	6,64	2,00-12,00	m/mm <sup>3</sup>
Linfócitos	2,32	0,50-4,90	m/mm <sup>3</sup>
Monócitos	1,88	0,30-2,00	m/mm <sup>3</sup>
Eosinófilos	0,35	0,10-1,49	m/mm <sup>3</sup>
Basófilos	0,02	0,00-0,10	

Neutrófilos (%)	59,3		%
Linfócitos (%)	20,7		%
Monócitos (%)	16,7		%
Eosinófilos	3,1		%
Basófilos	0,2		%
<b>Plaquetas</b>	180	175-500	m/mm <sup>3</sup>
VPM	<u>15,63</u>	5,0-12,0	fL

b) Outras provas

Gota fresca – negativo para microfilárias.

Auto-aglutinação em lâmina – negativo.

Esfregaço sanguíneo – negativo para hemoparasitas.

c) Perfil bioquímico

**Tabela 23** - Bioquímica sérica do Panzer. Os valores sublinhados encontram-se fora dos valores de referência.

Análises	Resultado	Valores de referência	Unidades
<b>Bioquímica sérica</b>			
ALT	40	17-78	U/L
ALP	227	47-254	U/L
Albumina	3,4	2,6-4,0	g/dl
Proteínas totais	<u>&gt;11</u>	5,0-7,2	g/dl
Creatinina	0,5	0,4-1,4	mg/dl
Ureia	11,9	9,2-29,2	mg/dl
Glicose	92	75-128	mg/dl

Devido ao aumento do valor das proteínas totais identificou-se uma hiperproteinemia sérica.

d) Análise de urina

**Tabela 24** - Análise de urina do Panzer.

<b>Análises</b>	<b>Resultado</b>
<b>Análise de urina</b>	
<b>Aspeto</b>	Normal
<b>pH</b>	6
<b>Densidade</b>	1,040
<b>Leucócitos</b>	-
<b>Proteínas</b>	++
<b>Glicose</b>	-
<b>Corpos cetónicos</b>	-
<b>Bilirrubina</b>	++
<b>Urobilinogénio</b>	-
<b>Hemoglobina</b>	-
<b>Cristais</b>	Bilirrubina

e) Raio X abdominal

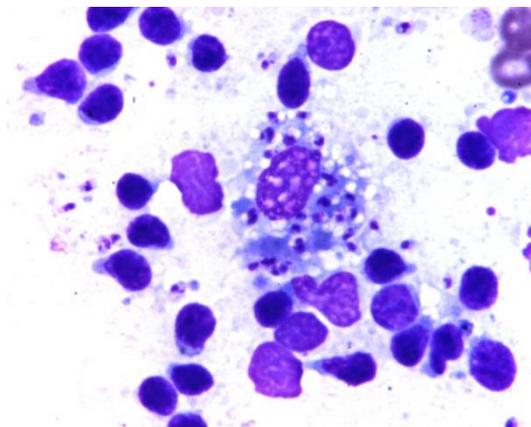
Observação de gás nos intestinos.

f) Ecografia abdominal

O Panzer, em termos ecográficos, apresentava: urina com sedimento; dilatação da pélvis renal (antes da fluidoterapia); diminuição da diferenciação córtico-medular renal; esplenomegalia acentuada; sinais de gastrite e enterite.

g) Citologia

Foi realizada uma punção de medula óssea. Posteriormente, fez-se a avaliação citológica utilizando esfregaços em lâmina corados por Giemsa, observados ao microscópio óptico nas ampliações de x400 e x1000.



**Figura 25** – Citologia de medula óssea (fotografia de André Vieira).

Presença de amastigotas de *Leishmania* no interior dos macrófagos,

h) Proteinograma

**Tabela 25** - Proteinograma do Panzer. Os valores sublinhados encontram-se fora dos valores de referência.

Index	Band	Rel,Area	Conc (g/dl)	Intervalo (g/dl)
<u>1</u>	Albumina	22,04%	2,69	2,20-3,50
<u>2</u>	Alfa 1	2,67%	0,33	0,50-0,80
<u>3</u>	Alfa 2	11,49%	1,40	0,50-0,80
<u>4</u>	Beta 1	18,84%	2,30	0,50-1,10
<u>5</u>	Beta 2	7,71%	0,94	0,30-0,70
<u>6</u>	Gama	37,26%	4,55	0,50-1,80

**PT:** 5,50 – 7,50 **A/G:** 0,50 – 1,20

Presença de hiperproteinemia sérica com hiperglobulinemia policlonal  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Rácio A/G normal (0,54).

#### i) Pressão arterial

**Tabela 26** - Resultados da medição das pressões arteriais do Panzer. T°C: temperatura; PS: pressão sistólica; PD: pressão diastólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; Obs: observações

<b>Hora</b>	<b>T°C</b>	<b>PS</b>	<b>PD</b>	<b>PAM</b>	<b>FC</b>	<b>Obs</b>
<b>12:30</b>		190	105	140	145	
		200	100	130	115	MAE
		200	100	145	100	Cuff
		190	120	145	100	6,5 cm
		190	115	140	100	

Presença valores de pressão arterial superiores a 160-170 mm/Hg. Hipertensão.

#### 2.4.7. Diagnóstico

LCan com lesão renal.

#### 2.4.8. Tratamento e evolução

Durante o internamento, o Panzer foi colocado a fluídos, a uma taxa de manutenção de 180 ml/h, e introduziu-se uma alimentação gastroentérica húmida adequada (Purina EN). A medicação administrada foi a seguinte: meloxicam, SC, SID; ranitidina (Zantac®, 2 mg/kg), SC, BID; trimetropim sulfadiazina (Bactrim forte®, 15 mg/kg), PO, BID; ampicilina (Hiperbiótico®, 10-20 mg/kg), IV, TID.

Teve alta passado 4 dias, apesar de não se saber a etiologia do quadro gastrointestinal. A terapêutica prescrita foi a seguinte: administração PO de meloxicam (0,1 mg/kg), SID, durante 4 dias consecutivos; administração PO de maleato de enalapril (Enalapril®, 3 mg/kg), BID; administração PO de alopurinol (Alopurinol - ratiopharm®, 10 mg/kg), BID; administração PO de doxiciclina (Actidox®, 10 mg/kg), SID; administração PO de amoxicilina e ácido clavulânico, BID.

#### 2.4.9. Acompanhamento do animal

Após 3 dias o animal voltou para reavaliação. Encontrava-se bem-disposto, com melhorias de apetite e fezes normais. Apresentava menos dor nos membros posteriores. Contudo, demonstrava alguma relutância ao levantar-se. Manteve a mesma medicação até ao próximo controlo.

No controlo seguinte, passados 15 dias, o Panzer apresentava-se muito bem-disposto e ativo. Os proprietários referiram que come muito bem, comprovando-se pelo aumento da condição corporal. Foi efetuado análise urinária, sendo que esta apresentava uma cor amarela escura, densidade de 1,038, duas cruces de proteína e bilirrubina, UP/C com valor de 0,2 (mínimo <0,5), e proteinograma, observando-se uma hiperproteinemia sérica com hiperglobulinemia policlonal  $\gamma$ . Manteve medicação com alopurinol e enalapril.

Na reavaliação posterior, passados dois meses, o animal apresentava-se com um peso superior e muito bem-disposto. Foi efetuada uma ecografia renal de controlo na qual os rins se encontravam com ligeira melhoria, apresentando uma maior diferenciação córtico-medular. Foram efetuadas algumas análises: UP/C com valor de 0,40; serologia *Leishmania* com resultado positivo (320); bioquímica hepática e renal, estando apenas a albumina diminuída. Manteve a medicação até ao próximo controlo, daí a 20 dias.

No controlo seguinte, estando as analíticas normais (albumina, creatinina), iniciou miltefosina (Milteforan®, 2 mg/kg), PO, SID, durante 28 dias consecutivos, para além da medicação já instituída. Controlo no final do tratamento.

Na reavaliação posterior, o Plutão apresentava-se bem-disposto e com um apetite voraz, segundo os donos. Foi efetuada ecografia renal de controlo na qual os rins apresentavam ligeiras alterações. As análises realizadas: UP/C com resultado de 0,4, serologia *Leishmania* com resultado positivo (320), e análise de urina, sendo que esta se apresentava de cor amarela, com densidade superior a 1,040, duas cruces de proteína e uma em bilirrubina. Manteve a terapêutica anterior, com exceção da miltefosina.

Passados 23 dias, o Panzer foi internado por apresentar perda de peso acentuado, hiporexia, claudicação do membro anterior esquerdo e uma temperatura de 40 °C. Foi colocado a fluídos, a uma taxa de manutenção de 200 ml/h, e foi realizado uma bateria de exames complementares. Em termos hematológicos apresentava uma anemia normocítica normocrómica e uma trombocitopenia, confirmada em lâmina. Esfregaço sanguíneo negativo para hemoparasitas. Em termos bioquímicos encontrava-se tudo dentro da normalidade. No proteinograma observou-se uma hiperproteinemia sérica com hiperglobulinemia policlonal  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$  e  $\gamma$ . Em termos sorológicos obteve-se resultado positivo (320). A medicação utilizada foi a seguinte: administração IV de metilprednisolona (Solo-Medrol®, 1,1 mg/kg), dose única; administração PO de doxiciclina (10 mg/kg), BID; administração PO de prednisolona (Lepicortinolo®, 0,5 mg/kg), BID; administração PO de famotidina (Famotidina® Generis, 0,5-1 mg/kg), SID; administração SC de tramadol (Tramal®, 2 mg/kg), BID; administração

PO de maleato de enalapril, BID; administração PO de alopurinol, BID. Teve alta no dia seguinte com prednisolona, doxiciclina e famotidina, com controlo marcado daí a 6 dias.

Na reavaliação, o Panzer apresentava melhorias, encontrando-se bem-disposto e com um melhor apetite. A medicação manteve-se, ajustando-se a dose de prednisolona a tomar, Novo controlo marcado passados 5 dias.

Neste novo controlo, o Panzer mantinha-se bem-disposto e com apetite, mas não conseguia adquirir peso. Foi realizada uma análise urinária, cujo valor de densidade era de 1,040 e proteína (+). A medicação manteve-se, ajustando-se a dose de prednisolona, e iniciou-se, de novo, a terapia para a leishmaniose com alopurinol e o enalapril. Foi aconselhado o início de antimoniato de meglumina (Glucantime®), mas proprietária preferiu aguardar. Novo controlo marcado passados 15 dias, ao qual faltou.

Passados 2 meses regressou ao hospital doente. Apresentava um pioderma generalizado, linfadenomegalia e diarreia. Foi realizada sorologia anti-*Leishmania*, positiva (320), proteinograma, com hiperproteinemia sérica com hiperglobulinemia policlonal  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$  e  $\gamma$ , bioquímica renal, valores normais, e citologia do linfonodo poplíteo, onde se observou inclusões compatíveis com *Leishmania*. Inicou-se terapia com cefradina (Cefradur®), BID, durante 10 dias consecutivos. Novo controlo marcado daí a 8 dias.

Nesta nova reavaliação iniciou tratamento com antimoniato de meglumina, SC, SID, durante 28 dias consecutivos. Novo controlo em 15 dias.

Neste controlo, o Panzer encontrou-se bastante pior, mais magro, com diarreia, temperatura elevada (40°C) e com um abscesso de grandes dimensões na tábua do pescoço, Foram realizados alguns exames, como bioquímica renal (normal), microhtc (40%), proteínas totais (9,6 g/dl – hiperproteinemia sérica) e tira reativa de urina (densidade de 1,030, sem proteinúria). A terapêutica prescrita foi: limpeza da ferida; dieta caseira exclusivamente; administração PO de amoxicilina e ácido clavulânico, BID; administração PO de metronidazol (Flagyl®, 15-25 mg/kg), BID. Novo controlo daí a 48 horas.

Nesta reavaliação, o Panzer apresentava alguma melhoria, Encontrava-se bem-disposto e bastante ativo, e as fezes apresentavam-se mais sólidas. Manteve a medicação da consulta anterior. Passados 5 dias telefonou-se ao proprietário. O Panzer encontrava-se bem-disposto, com uma melhoria das feridas e as fezes já possuíam um aspeto normal. Aconselhou-se a introdução da ração seca progressivamente. Foi marcado uma consulta de controlo daí a um mês.

Neste novo controlo apresentou-se ativo e bem-disposto. Ganhou alguma massa muscular. Foi realizado proteinograma, observando-se uma hiperproteinemia sérica com hiperglobulinemia policlonal  $\beta_2$ , e análise urinária (densidade 1,040, proteína e bilirrubina ++), Manteve-se terapêutica com antimoniato de meglumina e alopurinol.

### 3. DISCUSSÃO

A LCan está disseminada em Portugal, com regiões endêmicas bem identificadas como Castelo Branco, Portalegre e Beja, com uma seropositividade de 17,4%, 12,5% e 12,1% respetivamente, num estudo recente (Cortes *et al.*, 2012). Os distritos de Aveiro e Vila Real, locais onde foram realizados os estágios, apresentam uma seroprevalência de 1,4% e 8,4% (Cortes *et al.*, 2012). Assim, Vila Real apresenta uma seropositividade mais elevada comparativamente a Aveiro.

Durante os 8 meses de estágio vieram à consulta médico-veterinária 11 cães, aos quais foi diagnosticado leishmaniose, mostrando que o número de casos de LCan tem vindo a aumentar no nosso país, sobretudo em regiões em que estes não eram tão frequentes.

Muitos fatores predisponentes têm sido associados ao desenvolvimento de LCan, como a idade, a raça e a constituição genética (Solano-Gallego *et al.*, 2011). No presente estudo todos os cães possuíam pêlo de tamanho curto. Segundo Cortes *et al.* (2012) são os cães com este tamanho de pêlo que apresentam maior seroprevalência (6,7%), uma vez que os flebótomos se alimentam, preferencialmente, de zonas de pêlo pouco denso, como cabeça, focinho, pavilhões auriculares, áreas inguinais e perineais (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Tendo em conta a disposição racial e o estudo de Cortes *et al.* (2012) animais puros apresentam maior predisposição que os sem raça definida, o que se pode observar neste estudo, uma vez que o Messi, o Plutão e o Panzer são animais de raça, Labrador Retriever, Pugg e Dogue Alemão respetivamente. Em termos de idade, relatos apontam maior prevalência em cães menor que 3 anos e com idade superior a 8 anos (Solano-Gallego *et al.*, 2011), sendo o Plutão o único animal que se enquadra, visto que o Scott, o Messi e Panzer possuem idades compreendidas entre os 4 e os 7 anos. No que diz respeito aos hábitos de vida dos animais, todos eles eram cães com acesso ao interior e exterior, existindo risco de exposição aos flebótomos, o que corresponde a uma seroprevalência de 4,8% segundo Cortes *et al.* (2012).

Sendo a leishmaniose uma doença sistémica pode, potencialmente, envolver qualquer órgão e tecido, manifestando-se por uma multiplicidade de sinais clínicos, variando amplamente como consequência de números mecanismos patogénicos no processo da doença, de diferentes órgãos afetados e da diversidade de respostas imunitárias reproduzidas pelo animal (Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Os motivos pelos quais os proprietários trouxeram os seus animais aos Hospitais incluíram lesões cutâneas, perda de

apetite, claudicação, prostração, intolerância ao exercício, perda de peso, debilidade muscular e alterações oculares, estando de acordo com os estudos efetuados por Ciaramella, et al. (1997), Koutinas, et al. (1999) e Baneth, et al. (2008). Ao exame físico verificou-se, ainda, regiões de alopecia, linfadenomegalia generalizada, temperatura elevada, lesões oculares e prolongamento no tempo de anulação da prega de pele.

O Scott e o Messi apresentavam claudicação dos posteriores, sendo o caso do Scott predominantemente articular, observando-se uma tumefação do joelho esquerdo e presença de efusão ao exame ortopédico. As lesões articulares resultam quase sempre em claudicação. No entanto, não são a única razão pela qual um cão com leishmaniose pode claudicar. Lesões ósseas e nas almofadinhas plantares, polimiosite e neuralgia podem ser causas adicionais (Saridomichelakis, 2009). Ambos os animais apresentaram dor/desconforto aquando a manipulação, uma vez que não foi utilizada sedação para o efeito, uma vez que existiriam custos adicionais.

No caso do Plutão, para além da anorexia e cansaço, o quadro clínico era maioritariamente ocular, observando-se, ao exame oftalmológico, sinais de desconforto, como blefarospasmo, fotofobia e prurido ocular, corrimento ocular mucopurulento, hiperémia conjuntival ligeira, com hiperpigmentação e edema difuso da córnea, dando-lhe total opacidade, não permitindo a avaliação da câmara posterior e íris. No teste de Schirmer, método semiquantitativo que permite medir a produção da porção aquosa da película lacrimal pré-corneal, os resultados foram de 2 mm/min, permitindo o diagnóstico de uma QCS com hiperpigmentação corneal. As lesões oculares estão presentes em 16-80,5% dos casos de LCan, sendo que as mais frequentes envolvem a câmara anterior, incluindo a conjuntivite, blefarite, uveíte anterior, QCS, queratite e esclerite (Koutinas *et al.*, 1999; Naranjo *et al.*, 2005; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Na QCS o infiltrado inflamatório localizado em torno dos ductos lacrimais provoca a retenção da secreção e diminuição da produção lacrimal (Baneth *et al.*, 2008).

O Messi, para além da claudicação já supracitada e de uma linfadenomegalia generalizada, apresentava, predominantemente, um quadro dermatológico com dermatite exfoliativa não prurítica, com alopecia localizada no focinho, pavilhão auricular, região periocular e nuca, e uma hipotricose nas áreas interdigitais, cotovelo direito e membros. Para além disto, existia uma hiperpigmentação das áreas alvo e onicogribose. As alterações dermatológicas são as manifestações mais frequentes da LCan, estando presentes em aproximadamente 56-90% dos casos (Slappendel, 1988; Ciaramella *et al.*, 1997). A dermatite

exfoliativa está presente em 53-73% dos cães com leishmaniose e é caracterizada por seborreia e xerose, com ou sem alopecia, eritema e hiperpigmentação (Saridomichelakis, 2009).

O Panzer apresentava uma baixa condição corporal, debilidade muscular, um prolongamento do tempo de anulação da prega de pele e uma temperatura elevada (39,7° C). A febre, juntamente com a atropatia, representa apenas 4% das manifestações clínicas da LCan. Esta possui variadas causas, como infecções localizadas ou de caráter sistémico, alterações imunomediadas, neoplasias, entre outros (Dunn, 2000).

Ao exame físico só o Messi apresentou lindadenopatia detetável de caráter generalizado, que pode estar associado muitas vezes a situações de septicemia/bacteriemia, fases iniciais de infecções virais, a demodicose generalizada, ehrliquiose, leishmaniose e alterações auto-imunes (Dunn, 2000). Observou-se uma perda acentuada de peso e da condição corporal ao longo do acompanhamento/monitorização nos casos do Plutão e do Panzer. Esta perda de peso pode estar associada à anorexia e hiporexia, ou à competição nutricional entre hospedeiro e parasita, à reduzida absorção intestinal e à patologia renal crónica (Saridomichelakis, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

A eliminação dos diagnósticos diferenciais com intuito de chegar a um diagnóstico definitivo foi realizada de uma forma integrada, considerando a história pregressa do animal, o exame físico, dados laboratoriais básicos (não específicos), os resultados que detetam o parasita e/ou aqueles que avaliam e quantificam a resposta imunitária específica do hospedeiro vertebrado (Martínez-Moreno *et al.*, 1999; Paltrinieri *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011). Para além disto, foram realizados métodos imagiológicos, nomeadamente radiografia e ecografia abdominal.

No que diz respeito ao perfil hematológico observou-se uma diminuição do número dos glóbulos vermelhos e do hematócrito (no caso do Plutão), e uma leucopenia por neutropenia (no caso do Scott). Na LCan podemos encontrar situações de anemia não regenerativa, normocítica e normocrómica, com relativa frequência (Koutinas *et al.*, 1999; Baneth e Solano-Gallego, 2012), bem como leucocitose moderada, leucopenia, pancitopenia (inconstantes)(Petanides *et al.*, 2008) e trombocitopenia (Cortese *et al.*, 2009). A neutropenia do Scott poderá ter sido devido à existência de inflamação aguda, que faz com que o consumo de neutrófilos seja superior à sua produção. Foram efetuadas gotas frescas e esfregaços sanguíneos que deram negativo para microfilárias (dirofilariose) e hemoparasitas, não se observando, também, presença de formas amastigotas de *Leishmania*, o que corrobora o

descrito na bibliografia, que o sangue periférico não é tecido de eleição para visualização de leishmânias (Baneth e Aroch, 2008; Maia e Campino, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2010).

Em termos bioquímicos verificou-se uma hiperproteinemia sérica no caso do Scott, Plutão e Panzer, correspondendo ao descrito na bibliografia. O Plutão apresentava valores superiores aos limites normais na mensuração da creatinina sérica e foi relatado, por parte dos proprietários, presença de pu/pd. Esta pode indicar lesão renal e ser a única alteração clínica da LCan (Ciaramella e Corona, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Foi realizada análise de urina com fita reativa (fita que possui vários reagentes para cada parâmetro a ser avaliado, mudando de cor quando esta é mergulhada na urina) e do tipo II (a urina é avaliada em termos físicos, químicos e através da observação ao microscópio ótico), onde se verificou o aumento da densidade (no caso do Messi e Panzer) e proteinúria (no casos do Scott, Messi e Panzer), indicando lesão renal (Ciaramella e Corona, 2003). Assim sendo, deve ser efetuada a determinação do UP/C, situação executada apenas no caso do Scott. Este encontrava-se aumentado, confirmando a proteinúria já existente, devido à glomerulonefrite causada pela deposição de imunocomplexos (Martínez-Moreno *et al.*, 1999; Plevraki *et al.*, 2006). A avaliação da proteinúria deve ser sempre incluída nos exames complementares de LCan, uma vez a insuficiência renal é a principal causa de morte. O diagnóstico precoce da doença renal, o tratamento e uma dieta apropriada são deveras benéficos para o animal, podendo prolongar a sua vida (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Em relação aos proteinogramas realizados, do Messi, Plutão e Panzer, verificou-se um aumento das globulinas (especialmente das frações  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) policlonal, com aparecimento de bandas baixas, largas e irregulares. O aumento das  $\alpha$  globulinas caracteriza um aumento das proteínas da fase aguda, enquanto o aumento das frações beta e gamma corresponde ao aumento da produção de imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG) e complemento (Nelson e Couto, 2008). No caso do Messi não se verificou a hiperproteinemia sérica típica da LCan, mas este apresentou uma hipoalbuminemia (contrariamente aos restantes). A inexistência da hiperproteinemia pode ser justificada devido aos valores de hipoalbuminemia existente poderem mascarar a hiperglobulinemia. Estes valores baixos de albumina podem estar associados à perda de proteína por nefropatia, doença hepática, malnutrição ou à combinação destes fatores (Koutinas *et al.*, 1999; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Os únicos que apresentaram diminuição do rácio albumina/globulina séricas foram o Messi e o Plutão.

Na ecografia abdominal do Panzer visualizou-se uma esplenomegalia acentuada, justificando talvez a dor à palpação abdominal. Segundo Ciaramella e Corona (2003), a

esplenomegalia é um sinal que está presente em 54% dos casos de leishmaniose, sendo que a principal lesão consiste numa inflamação hiperplásica com depleção linfocitária.

Radiograficamente, o joelho do Scott apresentava evidência de derrame articular, sendo que as principais causas são traumáticas, como rutura do ligamento cruzado anterior, artrites erosivas e não erosivas, entre outras. Pensa-se que esta efusão seja originada de uma artrite, e que esta, por sua vez, causada pela leishmaniose. Para confirmação deveria ter sido efetuada uma citologia aspirativa por agulha fina para identificação das formas amastigotas, de forma livre ou nos macrófagos da membrana sinovial. A poliartrite é o resultado de uma reação de hipersensibilidade de tipo III com deposição de imunocomplexos. É, frequentemente, não erosiva, podendo ser ou não associada a sinovite, demonstrada clinicamente por calor e edema dos joelhos, e acompanhada por dor e, por vezes, atrofia muscular (Blavier *et al.*, 2001; Saridomichelakis, 2009).

Em todos os casos, exceto no do Scott, foi realizada avaliação citológica aspirativa por agulha fina através da análise de medula óssea. Podem ser utilizados outros tecidos como linfonodos, baço e pele (Baneth e Aroch, 2008; Maia e Campino, 2008). A punção medular efetua-se na face interna do fémur, na crista ilíaca ou na união costocondral (Martínez-Moreno *et al.*, 1999). Na avaliação microscópica da citologia foram identificadas formas amastigotas de *Leishmania*, possibilitando a estabelecimento de um diagnóstico rápido e conclusivo, uma vez que ao visualizarmos estas formas os cães são considerados infetados (Paltrinieri *et al.*, 2010).

Foi realizada sorologia anti-*Leishmania*, usando duas técnicas quantitativas, a IFAT no caso do Messi e a ELISA no caso do Scott. O Messi apresentou uma positividade de 5,27, enquanto o Scott apresentou título de 1280 (considerando o título limiar de positividade de 80), querendo dizer que ambos apresentavam uma elevada quantidade de anticorpos, estado em fase sintomática. Mais ainda, quanto maior a diluição, maior a carga parasitária. Títulos fracamente positivos podem ser detetados em animais que já se encontraram expostos ao agente, mas não desenvolveram doença clínica (Baneth e Aroch, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011). No caso da Messi foi realizado, também, um teste rápido imunocromatográfico qualitativo (Speed Leish K®), sendo o resultado positivo. Estes testes baseiam-se em antigénios recombinantes ou purificados (Miró *et al.*, 2008), são de utilização relativamente fácil e permitem obter o resultado no momento (Solano-Gallego *et al.*, 2011). O aparecimento de duas linhas, uma de controlo e outra de teste, independentemente da intensidade da coloração, indica um resultado positivo (Maia e Campino, 2008). Apesar destas vantagens,

este método apresenta uma sensibilidade mais baixa que os testes de IFAT e ELISA, sendo que os principais problemas são a ocorrência de falsos negativos e a impossibilidade de titular os anticorpos em resultados positivos (Gramiccia, 2011). É recomendado a realização de sorologia 6 meses após o início da terapêutica para quantificação do título de anticorpos (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Oliva *et al.*, 2010).

Segundo a escala de estadiamento clínico da LCan formulada pelo LeishVet (Solano-Gallego *et al.*, 2011), e tendo por base o resultado sorológico, sinais clínicos e dados laboratoriais, o Scott, o Plutão e o Panzer apresentaram-se no estadiamento clínico mais grave (III - doença grave). O Scott porque apresentava sinais clínicos derivados da deposição de imunocomplexos, como é o caso da artite; o Plutão pelos sinais oculares e o Panzer pela proteinúria. Por fim, o Messi apresentou-se no estágio II (doença moderada), tendo em conta os sinais cutâneos e a onicogribose. No caso do Scott a terapia instituída foi a combinação de antimoniato de meglumina e alopurinol. Este é considerado o protocolo mais eficaz e mais utilizado contra a leishmaniose (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Em relação ao Plutão e ao Panzer, ambos foram tratados apenas com alopurinol inicialmente. No caso do Messi o protocolo instituído foi a combinação de miltefosina e alopurinol. Este é uma alternativa à combinação de antimoniato de meglumina e alopurinol (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A miltefosina apresenta uma melhor eficácia clínica quando utilizada em conjunto com alopurinol (Oliva *et al.*, 2010).

Em todos os casos foram observadas melhorias após um mês da instituição da terapia, quer a nível físico quer a nível laboratorial. A monitorização dos animais deve ser efetuada após tratamento com antimoniato de meglumina ou 1 mês após início de tratamento com alopurinol (Oliva *et al.*, 2010) e, a partir daí, a cada 3-4 meses. Mais tarde, quando o cão estiver recuperado clinicamente, deve ser recomendada uma reavaliação a cada 6 meses ou uma vez por ano (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

No caso do Scott foram realizadas análises laboratoriais não específicas, as quais se encontravam dentro da normalidade. Já não apresentava claudicação, apoiando o membro corretamente. No controlo passado um mês e já com o antimoniato de meglumina terminado, iniciou nova terapia com domperidona durante 4 semanas consecutivas. Esta reduz significativamente e em poucas semanas, quer o título de anticorpos contra *Leishmania* quer os sinais clínicos indicadores da progressão da doença (Homedes, 2011).

No caso do Messi, na consulta de reavaliação passados 30 dias, este apresentava uma melhoria significativa, com regressão das lesões cutâneas e o desaparecimento da claudicação.

Término do tratamento com a miltefosina, mantendo-se o alopurinol. A duração do tratamento com alopurinol depende da gravidade da doença, da resposta clínica e parasitológica, e da tolerância individual a este fármaco. Alguns cães chegam a ser tão sensíveis ao ponto de não ser permitido a descontinuação do tratamento, enquanto outros possuem a capacidade de controlar a infeção sem a necessidade de um tratamento prolongado (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

O Plutão não voltou a comparecer no HVBV, não tendo assim mais dados relativos à sua evolução.

O acompanhamento do Panzer, após a saída do hospital veio a ser complicado, uma vez que em alguns controlos apresentou algumas melhorias, tanto a nível sintomatológico e físico, como a nível laboratorial, enquanto noutros recaídas, tendo sido necessário iniciar novos protocolos e adicionar outros fármacos. Os parâmetros a avaliar durante o tratamento dependem das alterações individuais de cada doente, mas em geral é aconselhado a realização de análises hematológicas, bioquímica sérica, sorologia, proteinograma e análise de urina com determinação do rácio proteína/creatinina (Miró e Moreno, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Foram utilizados mais dois protocolos: combinação alopurinol e miltefosina, e combinação alopurinol e antimoniato de meglumina.

A evolução foi favorável em dois dos cães em estudo, do Scott e Messi, existindo uma recuperação dos sinais de poliartrite e das lesões dermatológicas. No caso do Panzer foi e tem sido mais complicado, havendo momentos de melhoria e outros de declínio, talvez pelo facto de este possuir uma história de leishmaniose de maior duração que os restantes.

O prognóstico da LCan é, quase sempre, reservado, dependendo essencialmente da gravidade das lesões originadas no decorrer da infeção, do tempo decorrido até ao estabelecimento do diagnóstico, da resposta imunitária individual e, por fim, da progressão da doença (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

De referir a necessidade de implementação de uma profilaxia e controlo eficaz no que diz respeito ao cão, sendo este hospedeiro reservatório do protozoário em causa. Neste estudo não existiu qualquer informação acerca da desparasitação efetuada.

#### 4. CONCLUSÕES

Os animais com leishmaniose apresentam-se, potencialmente, com um leque variado de sinais clínicos, que podem induzir o médico veterinário em erro, levando-o a pensar tratar-se de outra doença. Para tal deve proceder-se a um diagnóstico rigoroso, efetuado habitualmente através de citologias aspirativas por agulha fina de linfonodos, baço, pele e/ou medula óssea, e testes sorológicos e moleculares, com a finalidade de confirmar a infecção e monitorizar a resposta ao tratamento.

Ao tratarmos os cães com leishmaniose, estamos, de forma indireta, a reduzir o risco de transmissão da infecção, quer a outros cães quer a pessoas, uma vez que durante o tratamento existe a diminuição (aproximadamente 3-4 meses) da infecciosidade para os vetores. De referir que é necessário o uso de inseticidas/repelentes, não só em cães saudáveis, mas também em cães infetados.

A componente prática do estágio foi extremamente enriquecedora, permitindo a aquisição de novos conhecimentos através do contato direto com a prática clínica e com os médicos veterinários, bem como a consolidação de conhecimentos adquiridos ao longo do curso.

A realização deste trabalho foi deveras útil e muito produtiva. Antes da pesquisa bibliográfica e escrita da dissertação desconhecia a existência de tantas manifestações clínicas da LCan e como esta podia ser confundida com tantas outras doenças, uma vez que existem bastantes diagnósticos diferenciais. Para além disso, o estágio e o acompanhamento da casuística diversificada presente ao HVBV e ao HVTM permitiu-me ampliar os meus conhecimentos em diversas áreas, como oftalmologia, dermatologia, ortopedia, medicina interna e patologia clínica, aprendendo novas técnicas de diagnóstico, revendo etapas de exames e conhecendo quais os protocolos terapêuticos utilizados.

Atualmente, as condições sócio-económicas dos proprietários dos animais constituem uma problemática na prática médico-veterinária, uma vez que impõe limites no diagnóstico e tratamento dos animais. Perante contenção de custos é necessário a seleção, por parte do médico veterinário, de quais os exames complementares executar, de modo a alcançar o diagnóstico definitivo do animal. Na LCan este assunto é muito importante, na medida em que, muitas vezes, é necessário a conjugação de vários métodos de diagnóstico para confirmação etiológica. Neste estudo, a abordagem diagnóstica mais eficaz incluiu a

visualização das formas parasitárias através de citologias aspirativas por agulha fina, de medula óssea, bem como a quantificação do título de anticorpos anti-*Leishmania*.

Em relação ao tratamento, existe, por vezes, a impossibilidade dos proprietários suportarem os custos daí inerentes, uma vez que este é dispendioso. Não obstante, nos casos apresentados procedeu-se ao tratamento dos animais com a terapêutica aconselhada pelo médico veterinário.

No que toca à profilaxia, é necessário sensibilizar os donos para importância do seu uso, devido à presença do parasita e da doença em território nacional. Para tal, deve ser aconselhado a aplicação de inseticidas/repelentes tópicos nos cães e/ou vacinação, bem com a utilização de domperidona (Leishguard®).

## 5. BIBLIOGRAFIA

Ait-Oudhia K, Harrat Z, Benikhlef R, *et al.* Canine Leishmania infantum enzymatic polymorphism: a review including 1023 strains of the Mediterranean area, with special reference to Algeria. *Acta Trop* 2011;118:80-86.

Altet L, Francino O, Solano-Gallego L, *et al.* Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect Immun* 2002;70:2763-2771.

Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J* 2008;175:14-15.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 2008;24:324-330.

Baneth G, Solano-Gallego L. Leishmaniasis In: Greene CE, ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4th ed: Saunders Elsevier, 2012.

Blavier A, Keroack S, Denerolle P, *et al.* Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J* 2001;162:108-120.

Bongiorno G, Habluetzel A, Houry C, *et al.* Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop* 2003;88:109-116.

Bottero E, Poggi M, Viglione M. Lesioni papulari indotte da Leishmania spp in 8 cani giovani. *Veterinaria I* 2006:33-36.

Calier H. (2010). Leish-Tec® – detalhes do produto. <http://www.hertapecalier.com.br/produtos/detalhes.php?produto=NjQ%3D&cat=6&sub=4&site=1&secao=3>

Cardoso L, Schallig HD, Cordeiro-da-Silva A, *et al.* Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;117:35-41.

Ciaramella P, Corona M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 2003;358-368.

Ciaramella P, Corona M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 2003;25:358-368.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 1997;141:539-543.

Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, *et al.* Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J* 2005;169:465-467.

Cortes S, Vaz Y, Neves R, *et al.* Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol* 2012;189:189-196.

Cortese L, Pelagalli A, Piantedosi D, *et al.* Effects of therapy on haemostasis in dogs infected with *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, or both combined. *Vet Rec* 2009;164:433-434.

Cortese L, Sica M, Piantedosi D, *et al.* Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 2009;164:778-782.

Costa FA, Goto H, Saldanha LC, *et al.* Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol* 2003;40:677-684.

Dantas-Torres F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends Parasitol* 2011;27:155-159.

Dunn J. "Textbook of small animal medicine". *WB Saunders* 2000;28-38:151-159.

Ferroglio E, Maroli M, Gastaldo S, *et al.* Canine leishmaniasis, Italy. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1618-1620.

Font A, Mascort J, Altimira J, *et al.* Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. *J Small Anim Pract* 2004;45:199-201.

Font A, Roura X, Fondevila D, *et al.* Canine mucosal leishmaniasis. *J Am Anim Hosp Assoc* 1996;32:131-137.

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, *et al.* Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J* 2008;175:45-52.

González AF. (2006). Hospital Veterinario Sierra Oeste: articulos H.V.S.O. [http://www.hvsierraoeste.com/paginas/articulos\\_hvso.html](http://www.hvsierraoeste.com/paginas/articulos_hvso.html)

Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol* 2011;181:23-30.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005;35:1169-1180.

Guerra LL, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, *et al.* Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 2009;104:611-622.

Holzmuller P, Bras-Goncalves R, Lemesre JL. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology* 2006;132 Suppl:S19-32.

Homedes J. (2011). Avanços ESTEVE no diagnóstico, prevenção e tratamento da Leishmaniose Canina  
<http://www.esteve.pt/EsteveFront/PressRoom.do?op=DN&con=3331&div=vet>

Juttner C, Rodriguez Sanchez M, Rollan Landeras E, *et al.* Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Vet Rec* 2001;149:176-179.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Pinelli E, *et al.* A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite* 1994;1:311-318.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, *et al.* Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 1999;35:376-383.

Koutinas AF, Scott DW, Kontos V. Skin lesions in canine leishmaniasis (kala-azar): a clinical and histopathological study of 22 spontaneous cases in Greece. *Vet Dermatol* 1992;3:121-130.

Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop* 2004;92:43-53.

Lopez R, Lucena R, Novales M, *et al.* Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed B* 1996;43:469-474.

Lucena R, Ginel PJ. Immunoglobulin isotype distribution of antinuclear antibodies in dogs with leishmaniasis. *Res Vet Sci* 1998;65:205-207.

MacNeill AL. Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. *Top Companion Anim Med* 2011;26:62-76.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 2008;158:274-287.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol* 2013;27:123-147.

Martínez-Moreno A, Nieto CG, Rodríguez SH. Leishmaniosis Canina In: Campillo MC, ed. *Parasitología veterinaria*: McGraw-Hill Interamericana, 1999.

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, *et al.* Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 2008;24:371-377.

Miró G, Moreno RM. *Leishmaniosis canina: manejo clínico y situación actual en España*: Bayer, 2006.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002;18:399-405.

Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, *et al.* Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1683.

Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, *et al.* Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2005;133:37-47.

Naucke TJ, Lorentz S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors* 2012;5:67.

Nelson RW, Couto CG. *Small Animal Internal Medicine*: Elsevier Health Sciences, 2008.

Noli C, Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol* 2005;16:213-232.

Oliva G, Roura X, Crotti A, *et al.* Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010;236:1192-1198.

Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, *et al.* Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet Dermatol* 2005;16:187-191.

Palacio J, Liste F, Gascon M. Urinary protein/creatinine ratio in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Vet Rec* 1995;137:567-568.

Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010;236:1184-1191.

Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, *et al.* Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet Parasitol* 2009;165:327-331.

Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, *et al.* Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol* 2005;104:227-237.

Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, *et al.* Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 2008;22:866-872.

Petersen CA. Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States. *Top Companion Anim Med* 2009;24:182-188.

Petersen CA, Barr SC. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2009;39:1065-1074, vi.

Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJ, *et al.* *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur J Immunol* 1995;25:1594-1600.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 1994;62:229-235.

Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, *et al.* Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in Canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 2006;20:228-233.

Pugliese A, Di Pietro S, Giudice E. Clinical and diagnostic patterns of leishmaniasis in the dog. *Veterinary Research Communications* 2006;30:39-43.

Pumarola M, Brevik L, Badiola J, *et al.* Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J Comp Pathol* 1991;105:279-286.

Ramsey I. *BSAVA Small Animal Formulary*: Wiley, 2011.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;128:87-95.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, *et al.* Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol* 2006;146:303-311.

Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, *et al.* Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2564-2572.

Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, *et al.* Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol* 2005;91:970-972.

Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 2002;3:1041-1047.

Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, *et al.* Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 2008;39:36.

Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol* 2009;20:471-489.

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q* 1988;10:1-16.

Smith BE, Tompkins MB, Breitschwerdt EB. Antinuclear antibodies can be detected in dog sera reactive to *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *Ehrlichia canis*, or *Leishmania infantum* antigens. *J Vet Intern Med* 2004;18:47-51.

Soi L, Nathan R, Jeffrey B. Population changes in *Leishmania chagasi* promastigote developmental stages due to serial passage. *J Parasitol* 2010;96:1134-1138.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2009;165:1-18.

Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 2011;4:86.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 2001;39:560-563.

Tassi P, Ormas P, Madonna M, *et al.* Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res Vet Sci* 1994;56:144-150.

Terrazzano G, Cortese L, Piantedosi D, *et al.* Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;110:331-337.

Torrent E, Leiva M, Segales J, *et al.* Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *J Small Anim Pract* 2005;46:549-552.

Troxel MT. Infectious neuromuscular diseases of dogs and cats. *Top Companion Anim Med* 2009;24:209-220.

Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, *et al.* Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec* 2000;146:698-703.

Virbac. (2011). Canileish - Resumo de características do medicamento. [http://www.virbac.pt/p-virbacptpubpt/display.aspx?srv=p-virbacpt&typ=pub&lang=pt&cmd=view&style=styles/specie.xsl&select=PRODUCT\[@ID\\$eq\\$PRODUCT\\_140\]&affp=&](http://www.virbac.pt/p-virbacptpubpt/display.aspx?srv=p-virbacpt&typ=pub&lang=pt&cmd=view&style=styles/specie.xsl&select=PRODUCT[@ID$eq$PRODUCT_140]&affp=&)

Zoetis. (2005). Leishmune - Vacina contra a Leishmaniose Visceral Canina. <http://www.leishmune.com.br/>