

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Leishmaniose Canina

Revisão da literatura científica e apresentação de casos clínicos

Versão final

João Diogo Lopes Amaro Ramalho

Orientador: Prof. Doutor Luís Cardoso
Co-Orientador: Doutor Ricardo Almeida



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Vila Real 2015

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Leishmaniose Canina

Revisão da literatura científica e apresentação de casos clínicos

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

Versão final

João Diogo Amaro Ramalho

Orientador: Prof. Doutor Luís Cardoso
Co-Orientador: Doutor. Ricardo Almeida

Composição do Júri:

Vila Real, 2015

O conteúdo do presente trabalho é da inteira responsabilidade do autor.

Agradecimentos:

Agradeço ao Prof. Doutor Luís Cardoso por todo o apoio e disponibilidade prestados durante a elaboração deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Ricardo Almeida não só pela ajuda prestada durante a elaboração desta dissertação, mas também por todos os conhecimentos transmitidos durante os 3 meses de estágio curricular que realizei na Clínica Veterinária VetPóvoa em Coimbra.

Agradeço a toda a restante equipa da Clínica Veterinária VetPóvoa, nomeadamente à Dra. Carolina Almeida, Dra. Carolina Taís, Dr. Gonçalo Neves, Dra. Filipa Sá, às auxiliares Lina, Rita e Cristina por todo o apoio e transmissão de conhecimentos ao longo de todos os estágios realizados na sua companhia. Agradeço ainda à minha companheira de estágio, Ana Carvalho por todo o companheirismo.

Agradeço a toda a equipa do Hospital Abros, em Ourense - Espanha nomeadamente ao Dr. Hector Asenjo, à Dra. Mari Gonzalez, à Dra. Elena Ordoñez, ao Dr. Daniel Capas e a toda a restante excelente equipa de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares pela partilha de conhecimentos, espírito de equipa e companheirismo vividos nos 2 meses de estágio. Agradeço ainda à minha colega de estágio Rita Silva pelo boa disposição e entreaajuda.

Agradeço ainda a todos os meus colegas de curso, que me acompanharam nesta longa jornada, desde os companheiros que fiz na Escola Universitária Vasco da Gama, bem como às amigas travadas na UTAD.

Um especial agradecimento aos meus pais por serem tão bons na sua função de pais, mas também de amigos e conselheiros. Foram imprescindíveis não só para a minha formação académica, mas também para a minha formação pessoal. Um muito obrigado.

Agradeço também aos meus avós por terem sido sempre um apoio para mim e para a minha família.

Por último, agradeço à Fipa Teixeira toda a sua dedicação, por ser o meu apoio todos os dias tornando fáceis todos os momentos que poderiam ser complicados.

Resumo

A leishmaniose é uma doença parasitária de caráter zoonótico, causada por protozoários do género *Leishmania* spp. cuja transmissão ocorre principalmente por via vetorial, através de insetos flebotomíneos infetados. O cão apresenta-se como o principal hospedeiro reservatório de infeção para o Homem, no entanto outras espécies também podem ser afetadas como outros canídeos selvagens, roedores e gato. A leishmaniose canina encontra-se disseminada por várias regiões, especialmente na bacia do Mediterrâneo, algumas regiões da Ásia e da América Central e do Sul.

Esta dissertação inclui a descrição de três casos clínicos acompanhados durante o período de estágio curricular (Novembro 2014 a Março 2015) na Clínica veterinária VetPóvoa, em Coimbra e Hospital veterinário Abros em Ourense, Espanha. Os três animais apresentaram uma ampla diversidade de sinais clínicos nomeadamente lesões cutâneas ulceradas, perda de peso, onicogribose, febre e artropatia. O diagnóstico foi realizado principalmente através da análise dos sinais clínicos manifestados e de testes serológicos quantitativos realizados em laboratório externo. O protocolo terapêutico instituído consistiu na combinação de antimoniato de meglumina com alopurinol e a eficácia do mesmo diferiu entre os três animais. Os animais foram também sujeitos à monitorização do tratamento após o seu término no sentido de avaliar a recorrência dos sinais clínicos.

Palavras-chave: cão, diagnóstico, *Leishmania infantum*, leishmaniose canina, lesões cutâneas, tratamento

Abstract

Leishmaniosis is a zoonotic parasitic disease, caused by protozoa of the genus *Leishmania* spp, which transmission occurs mainly by the bite of an infected phlebotomine “sandfly” insect. The dog is the main reservoir host for human infection, but other species can be affected like wild dogs, rodents or cat. Canine leishmaniosis (LCan) is found widespread, but it’s found especially in mediterranean basin, some Asian regions and in South and Central America.

This study refers and describes three case reports of dogs with clinical leishmaniosis that were observed during the curricular practice period (from November 2014 to March 2015) in Clínica Veterinária VetPóvoa, in Coimbra, Portugal, and Hospital Veterinário Abros in Ourense, Spain. The three dogs showed a large range of clinical signs, including ulcerated skin lesions, wheight loss, fever, onicogriphosis and arthropathy. The diagnosis was established by the analises of clinical signs and the results of quantitative serologic tests, executed in an extern laboratory. The therapeutic protocol used in all cases was the administration of meglumine antimoniate with allopurinol. After the end of therapeutic protocols the animals were monitored due the recurrence of the clinical signs.

Keywords: diagnostic, dog, *Leishmania infantum*, canine leishmaniosis, skin lesions, treatment

Índice

INTRODUÇÃO.....	1
1. Etiologia.....	4
1.1. Morfologia celular.....	5
2. Epidemiologia.....	6
2.1 Leishmanioses humana.....	6
2.2 Leishmaniose canina.....	7
3. Transmissão.....	10
3.1 Hospedeiro invertebrado.....	10
3.2 Morfologia e bioecologia do hospedeiro intermediário.....	11
3.3 Outros potenciais vetores.....	14
3.4 Transmissão não vetorial.....	15
3.5 Transmissão vertical e venérea	16
3.6 Transmissão por transfusão sanguínea	16
4. Patogenia.....	17
4.1 Imunidade inata.....	17
4.2 Imunidade específica e adquirida.....	19
5. Sinais clínicos.....	21
5.1 Lesões dermatológicas.....	22
5.2 Linfadenopatia.....	23
5.3 Lesões renais	23
5.4 Lesões oculares.....	24
5.5 Lesões no sistema locomotor.....	25
5.5.1 Tecido muscular.....	25
5.5.2 Ossos e articulações.....	25
5.6 Lesões hemorrágicas.....	26
5.7 Alterações hematológicas.....	26
5.8 Aparelho reprodutor.....	26
5.9 Lesões digestivas.....	27
5.10 Lesões cardiovasculares	27
5.11 Outros órgãos: baço, sistema nervoso central e mucosa oral	28
6. Diagnóstico.....	29
6.1 Métodos não específicos.....	29

6.2 Métodos específicos.....	31
6.2.1 Diagnóstico parasitológico.....	31
6.2.1.1 Avaliação citológica.....	31
6.2.1.2 Avaliação histológica.....	32
6.2.1.3 Cultura do parasita.....	33
6.2.2 Xenodiagnóstico.....	33
6.2.3 Análise serológica.....	33
6.2.4 Imunofluorescência indireta (IFI).....	34
6.2.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	35
6.2.6 Imunocromatografia.....	35
6.2.7 Métodos de pesquisa molecular.....	36
7. Tratamento.....	38
7.1 Antimoniais pentavalentes.....	39
7.2 Alopurinol.....	40
7.3 Miltefosina.....	41
7.4 Anfotericina B.....	42
7.5 Aminosidina.....	43
7.6 Marbofloxacina.....	43
7.7 Metronidazol e espiramicina.....	43
7.8 Imunoestimulantes (domperidona).....	44
7.9 Monitorização do tratamento.....	46
8. Prognóstico.....	46
9. Prevenção e controlo.....	47
CASOS CLÍNICOS.....	52
Caso clínico nº 1 – Rex.....	52
Caso clínico nº 2 – Danko.....	56
Caso clínico nº 3 – Brandán.....	62
DISCUSSÃO.....	66
CONCLUSÃO.....	72
BIBLIOGRAFIA.....	74
ANEXOS.....	86

Índice de figuras

Figura 1: Formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	5
Figura 2: Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> intramacrofágicas.....	5
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	17
Figura 4: Principais diferenças imunológicas entre animais infectados sintomáticos e assintomáticos.....	20
Figura 5: Manifestações clínicas da LCan.....	28
Figura 6: Esquematização da abordagem diagnóstica recomendada para LCan.....	38
Figura 7: Rex no primeiro dia de consulta.....	52
Figura 8: Lesão ulcerada no codilho direito (Rex).....	53
Figura 9: Primeiro dia de tratamento (Rex).....	53
Figura 10: Quatro dias após o tratamento (20 de janeiro de 2015) (Rex).....	54
Figura 11: Sexto dia após o tratamento (22 de janeiro de 2015) (Rex).....	54
Figura 12: Oito dias após o início da terapia (24 de janeiro de 2015) (Rex).....	55
Figura 13: Danko no primeiro dia de consulta.....	56
Figura 14: Lesões ulcerocrostosas na região perinasal e periocular (Danko).....	57
Figura 15: Lesões ulceradas na região perinasal e nos lábios (Danko).....	57
Figura 16: Lesões ulcerocrostosas na face interna do pavilhão auricular direito (Danko).....	58
Figura 17: Lesões ulceradas na região perinasal e periocular (Danko).....	59
Figura 18: Brandán na primeira consulta.....	62
Figura 19: Onicogribose (Brandán).....	62
Figura 20: Lesão ulcerada na extremidade auricular direita (Brandán).....	63
Figura 21: Lesão ulcerada na extremidade auricular esquerda (Brandán).....	63
Figura 22: Lesão ulcerocrostosa nas saliências ósseas (asas do íleo) (Brandán).....	63
Figura 23: Lesão ulcerocrostosa nas saliências ósseas (codilho esquerdo) (Brandán).....	63

Índice de tabelas:

Tabela 1: Percentagem de ocorrência dos sinais clínicos mais frequentemente apresentados nos animais com LCan clínica.....	22
Tabela 2: Bioquímica sérica do Rex no dia da primeira consulta (6 de janeiro de 2015).	86
Tabela 3: Bioquímica sérica do Rex no dia 16 de janeiro de 2015 (10 dias após a primeira consulta).	86
Tabela 4: Bioquímica sérica do Rex no seu 4º dia de tratamento com Glucantime® (20 de janeiro de 2015).....	86
Tabela 5: Bioquímica sérica do Rex no seu último dia de tratamento com Glucantime® - 02 de fevereiro de 2015.	86
Tabela 6: Bioquímica sérica do Rex no dia 4 de abril de 2015 (2 meses após o fim do tratamento).....	87
Tabela 7: Bioquímica sérica do Danko no primeiro dia de consulta (4 de março de 2015).....	88
Tabela 8: Hemograma do Danko no primeiro dia de consulta (4 de março de 2015).....	88
Tabela 9: Urinálise do Danko no primeiro dia de consulta (4 de março de 2015)..	89
Tabela 10: Hemograma do Danko 21 dias após o início do tratamento (2 de abril de 2015)	89
Tabela 11: Hemograma do Danko 24 dias após o início do tratamento (5 de abril de 2015).....	90
Tabela 12: Bioquímica sérica do Brandán no primeiro dia de consulta (dia 23 de fevereiro de 2015).	91
Tabela 13: Hemograma do Brandán no primeiro dia de consulta (23 de fevereiro de 2015).....	91
Tabela 14: Proteinograma do Brandán 8 dias após o primeiro dia de consulta (8 de março de 2015).....	92
Tabela 15: Proteinograma do Brandán 3 meses após o primeiro dia de consulta (28 de maio de 2015).....	92

Lista de Abreviaturas

Ac	anticorpos
ALT	alanina-amino-transferase
AST	aspartato-amino-transferase
ALP	fosfatase alcalina
ARN	ácido ribonucleico
BID	administração de 12 em 12 horas (<i>bis in die</i>)
BUN	ureia nitrogenada sérica
CAAF	citologia aspirativa por agulha fina
CAP	célula apresentadora de antígeno
CVBD diseases”)	doenças caninas transmitidas vetorialmente (“canine vector borne diseases”)
ELISA	ensaio imunoenzimático (“enzyme-linked immunosorbent assay”)
GGT	gama glutamil transferase
IFI	teste de imunofluorescência indireta
IFN	interferão
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IM	via intramuscular
IRIS	International Renal Interest Society
IV	via intravenosa
FCM	sistema fagocítico mononuclear
FNTα	fator α de necrose tumoral
fPPG	proteofosfoglicano filamentoso
kADN	ADN do cinetoplasto
LCan	leishmaniose canina
LiESP	proteínas secretadas-excretadas por <i>L. infantum</i>
LPG	lipofosfoglicano glicoconjugado de superfície
LCF	<i>Leishmania</i> chemotactic factor
MCH	complexo principal de histocompatibilidade
PO	via oral (<i>per os</i>)

PPT	proteínas plasmáticas totais
PCR	reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”)
PSG	gel segregado por promastigotas(“promastigote secretory gel”)
QA	<i>Quillaja saponaria</i>
SC	via subcutânea
SID	a cada 24 horas (<i>semel in die</i>)
SNC	sistema nervoso central
TID	administração de 8 em 8 horas (<i>ter in die</i>)
Th	linfócitos T auxiliares
UCP	rácio proteína/creatinina urinário

INTRODUÇÃO

A leishmaniose canina (LCan) é uma doença zoonótica causada por protozoários do género *Leishmania* cuja transmissão é feita vetorialmente através de insetos do género *Phlebotomus*. Engloba-se dentro das doenças caninas transmitidas vetorialmente (CVBD – “canine vector borne diseases”), ou seja, pertence a um grupo de enfermidades transmitidas por vetores, nomeadamente através de artrópodes como carraças e insetos. Estas doenças assumem grande importância global devido à sua elevada morbilidade e mortalidade, e também devido à maioria destes agentes patogénicos transmitidos serem capazes de causar infeção humana. De entre os agentes zoonóticos destacam-se bactérias (incluindo rickettsias), protozoários e nematodes [1].

Existem várias espécies de *Leishmania*, das quais se destaca *Leishmania infantum*, sendo a espécie mais estudada e responsável pela maioria das infeções na Europa, nomeadamente na bacia do Mediterrâneo. Nos seres humanos, a doença apresenta três formas clínicas: a leishmaniose visceral, a leishmaniose cutânea e a leishmaniose mucocutânea [2].

O principal hospedeiro definitivo de *L. infantum* é o cão, embora outras espécies possam ser afetadas, como é o caso do homem e do gato. No gato, novos estudos demonstraram uma prevalência considerável, principalmente em áreas de endemicidade, mas bastante inferior à prevalência da infeção em cães [3].

Os hospedeiros intermediários são insetos do género *Phlebotomus*, e em Portugal destacam-se principalmente duas espécies: *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus perniciosus*, sendo o primeiro importante na propagação do protozoário no ciclo silvestre e o segundo na manutenção do parasita no ciclo doméstico, mantendo assim a endemicidade da patologia (4,5).

As fêmeas deste inseto, para completarem o ciclo de vida terão de efetuar uma alimentação sanguínea no hospedeiro vertebrado. No decorrer dessa alimentação, a forma infetante (forma promastigota metacíclica), que está alojada na orofaringe do inseto, entra na circulação linfática e é captada por macrófagos em circulação, sendo consequentemente fagocitada. Através da inibição dos lisossomas, e bloqueio da ativação macrofágica por parte de *Leishmania*, a digestão do protozoário não é eficaz, ocorrendo a transição para a forma amastigota (forma encontrada no hospedeiro definitivo), infetante para o hospedeiro intermediário. Os macrófagos infetados migram através da circulação linfática até ao linfonodo regional e, caso o animal seja suscetível à infeção, existe disseminação sistémica do parasita. O vetor, ao ingerir sangue de um animal

infetado, liberta as formas amastigotas no seu intestino, as quais irão progredir e diferenciar-se através de várias etapas até à forma infetante, capaz de causar infeção no hospedeiro vertebrado [6].

A patogenia e a evolução da doença no hospedeiro vertebrado, nomeadamente no cão, dependem de vários fatores, nomeadamente fatores relativos ao parasita, bem como de fatores intrínsecos ao hospedeiro vertebrado [5]. Dos fatores relativos ao parasita os mais importantes são a espécie e o zimodeme do parasita. Diferentes espécies e diferentes zimodemes podem apresentar virulência e antigenicidade variáveis [5]. Os fatores condicionantes da patogenia e evolução da doença no hospedeiro vertebrado são fatores genéticos e, conseqüentemente, a resposta imunitária do animal ao parasita, que consoante a mesma pode tornar o animal suscetível ou resistente à infeção e desenvolvimento de manifestações associadas à LCan [6]. Fatores secundários como o estado nutricional e estado hígido, nomeadamente a coexistência de infeções e estados de imunodepressão, também condicionam grandemente a resposta imunitária eficaz [7].

Uma resposta imunitária eficaz traduz-se pela seleção dos linfócitos Th1 (linfócitos T “helper” ou auxiliares), produtores de interferão-gama (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF, “tumor necrosis factor”), que induzem a ativação macrofágica e respetiva destruição das formas amastigotas intramacrofágicas [6].

Quando a resposta imunitária seleciona os linfócitos Th2 existe a produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, as quais não induzem a ativação macrofágica e induzem a proliferação de linfócitos B, os quais produzem imunoglobulinas nomeadamente imunoglobulinas G (IgG) Esta resposta imunitária não consegue induzir a destruição das formas amastigotas intramacrofágicas, permitindo a evolução da doença [6].

A extensa produção de anticorpos contribui fortemente para a maioria das manifestações clínicas da doença. A contínua estimulação antigénica por *Leishmania* nestes animais suscetíveis contribui para a formação de imunocomplexos circulantes, que se depositam em vários locais nomeadamente no glomérulo renal, articulações e úvea [6].

As manifestações clínicas da leishmaniose canina são muito variadas, desde alterações externas facilmente identificáveis, como mau estado geral, mau estado do pelo, alopecia periorbital, epistaxe, onicogrifose, linfadenomegalia, artrites, uveítes e conjuntivites. Os órgãos internos mais afetados são o rim, fígado e baço, sendo frequente a existência de hepatomegalia, esplenomegalia e alterações estruturais e funcionais do

rim [8].

O diagnóstico desta doença passa pelo diagnóstico parasitológico, serológico e molecular. Os testes serológicos podem ser qualitativos, como o teste rápido, ou quantitativos como o ensaio imunoenzimático (ELISA – “enzyme-linked immunosorbent assay”) e imunofluorescência indireta (IFI). O teste de pesquisa de ADN do parasita pela reação em cadeia da polimerase (PCR – “polymerase chain reaction”) atesta com grande sensibilidade e especificidade a presença do parasita no animal [7].

O tratamento mais utilizado consiste na administração de fármacos leishmanicidas e estimulantes do sistema imunitário. No tratamento leishmanicida os fármacos mais utilizados são o antimoniato de meglumina, miltefosina e alopurinol. O fármaco mais utilizado na estimulação do sistema imunitário é a domperidona [7].

No âmbito da prevenção atua-se a dois níveis: prevenção da picada do vetor, através de repelentes à base de piretróides sintéticos; manter o animal em casa desde o anoitecer até ao amanhecer, ou seja, no período mais favorável à picada do vetor; e alteração do habitat do vetor. Existe também profilaxia médica, com introdução no mercado europeu relativamente recente, através de vacina [9].

O meu interesse ao fazer incidir o tema desta dissertação na leishmaniose advém de contatos anteriores com animais com esta patologia, e pelo facto de esta representar um desafio no âmbito clínico, nomeadamente por ter diferentes formas de apresentação clínica e subsequente dificuldades no diagnóstico, terapêutica e profilaxia. Nesta dissertação desenvolvi uma revisão bibliográfica atualizada sobre vários aspetos desta patologia e descrevo três casos clínicos por mim assistidos nos locais onde realizei a componente prática desta dissertação, concretamente na Clínica Veterinária VetPóvoa, no concelho de Coimbra, e também do Hospital Veterinário Abros, em Ourense, Espanha.

1. Etiologia:

Os protozoários responsáveis pela leishmaniose pertencem taxonomicamente ao reino Protista, filo Sarcomastigophora, à classe Zoomastigophora, à ordem Kinetoplastida e à família *Trypanosomatidae* e subsequentemente ao género *Leishmania*. O género *Leishmania* por sua vez pode-se dividir em dois subgéneros, nomeadamente *Leishmania* e *Viannia* [10].

O subgénero *Leishmania* inclui as espécies: *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, o complexo *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*)[11] e o complexo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*). O subgénero *Viannia* é representado por quatro espécies principais: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamenesis* e *L. (V.) peruviana* [12].

As várias espécies de *Leishmania* podem depois agrupar-se segundo várias classificações através de diferentes métodos, entre os quais a análise e comparação de segmentos de ADN, através do uso de anticorpos monoclonais, padrões de migração de isoenzimas por eletroforese e análise de antigénios de superfície [10].

Destes métodos destaca-se a análise dos padrões de migração de isoenzimas por eletroforese, que é referida como o método “gold standard” (padrão-ouro) para classificação dos agentes *Leishmania* spp. Neste método são analisadas 15 isoenzimas segundo o sistema de Montpellier (MON). *L. infantum* apresenta um elevado polimorfismo nas suas isoenzimas existindo até ao momento 31 zimodemes conhecidos, ou seja, parasitas com um padrão isoezimático comum [13]. O zimodeme MON-1 é o mais prevalente tanto nas infeções caninas como Humanas [14].

Em cães em Portugal apenas foram detetados os zimodemes MON-1 e MON-98 de *L. infantum*, embora também tenha sido isolado o zimodeme MON-24 num paciente humano com VIH (vírus da imunodeficiência humana) e num vetor flebotomíneo (*P. ariasi*). Também foi isolado o zimodeme MON-18 de *L. donovani*, de um paciente humano com VIH [15].

Apesar de este método ser o mais amplamente utilizado para classificar *Leishmania* spp., tem algumas limitações pois é necessário um cultivo do parasita e também podem existir alterações no genoma parasitário que não se refletem em alterações nas isoenzimas. Neste sentido o método mais específico para diferenciar e classificar *Leishmania* spp. é a análise do genoma parasitário por PCR e polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RLFP) [16].

1.1 Morfologia celular:

Os parasitas *Leishmania* são dimórficos e heteroxenos, ou seja apresentam duas formas parasitárias principais e necessitam de dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado, para concluir o seu ciclo parasitário [17].

A forma amastigota é a forma parasitária encontrada no hospedeiro vertebrado, e consiste numa forma celular arredondada ou oval, com cerca de 2 a 4 μm de diâmetro. Através da coloração celular de Wright ou Giemsa é visível uma coloração azul pálida do citoplasma, como um núcleo relativamente grande de coloração vermelha conforme é possível visualizar na Figura 1. No mesmo plano que o núcleo, mas fazendo um ângulo reto com o mesmo, evidencia-se uma estrutura celular em forma de bastão com coloração entre o vermelho escuro e o violeta, que se denomina cinetoplasto [18]. Esta forma parasitária é encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), nomeadamente dentro dos fagolisossomas dos macrófagos [17].

A outra forma parasitária consiste no promastigota (Figura 2), que se encontra desde o intestino médio até à porção mais anterior do intestino do hospedeiro invertebrado. Comparativamente à forma amastigota, aquela é mais estreita e comprida (15 a 30 μm) e apresenta um aspeto fusiforme, com flagelo comprido na porção anterior, é extracelular e bastante móvel, principalmente as formas promastigotas metacíclicas (10,17).

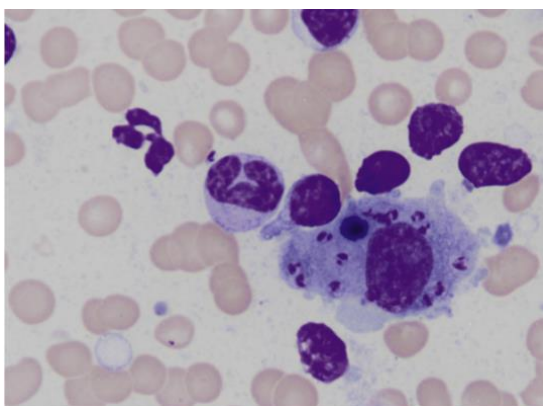


Figura 1: Formas amastigotas de *Leishmania* intramacrofágicas [136]

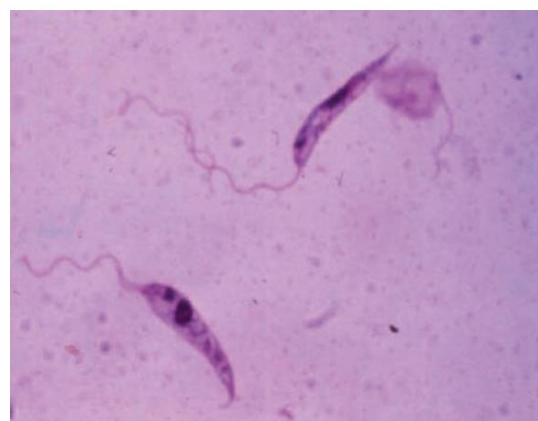


Figura 2: Formas promastigotas de *Leishmania* [10]

2. Epidemiologia:

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas zoonóticas com transmissão vetorial, que se caracterizam por distintas apresentações clínicas, tanto nos animais como nos seres humanos. O cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) assume-se como o principal hospedeiro definitivo de *L. infantum*, sendo a principal espécie reservatária de infecção para os humanos [19].

Principalmente em zonas endêmicas, *L. infantum* pode também afetar outros animais, nomeadamente gatos, cavalos e mamíferos silváticos como o rato europeu-da-madeira (*Apodemus sylvaticus*), o murganho (*Mus musculus*), o rato-castanho ou ratazana (*Rattus norvegicus*), martas (*Martes martes*), a gineta (*Geneta geneta*), a doninha (*Mustela nivalis*) e a raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) (12, 19).

Em zonas onde a leishmaniose é endêmica a seroprevalência de anticorpos *anti-Leishmania* em gatos pode chegar aos 68%[20]. Num estudo evidenciou-se por meio de xenodiagnóstico, a infecção de um vetor flebotomíneo após a realização de uma refeição sanguínea num gato infetado por *Leishmania*, sugerindo que este animal pode desempenhar um papel de hospedeiro reservatório secundário de *L. infantum* [21].

2.1 Leishmanioses humana

Estima-se que anualmente existam 2 milhões de novos casos de infecção humana numa população exposta de 350 milhões, sendo as leishmanioses referidas como “doenças tropicais negligenciadas” [22].

A maioria das espécies de *Leishmania* são zoonóticas, mas algumas assumem-se como maioritariamente antroponóticas, ou seja, são transmitidas de humano a humano por meio de picada de flebótomos, e em que os seres humanos se assumem como a principal espécie reservatária de infecção. A principal espécie antroponótica é *L. donovani*, e está presente na Índia, costa oriental de África, Bangladesh e Nepal. Os animais, aparentemente, não têm alguma importância no ciclo epidemiológico de *L. donovani* [22]. Nos seres humanos as apresentações clínicas diferenciam-se em leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV), sendo que a *L. infantum* é essencialmente causadora de LV, podendo, no entanto, também ocorrer apresentações cutâneas [23].

A infecção visceral zoonótica em humanos está associada a *L. infantum*, e ocorre principalmente nos países da bacia do Mediterrâneo, no Médio Oriente, Ásia Central, China e América do Sul [10]. Estudos recentes, através das similaridades genéticas concluíram que *L. infantum* e *L. chagasi* são a mesma espécie [16]. O cão assume-se

como o principal reservatório de *L. infantum*, sendo esta espécie em humanos causadora principalmente de LV [24].

No final da década de 1980 esta doença caracterizava-se por atingir principalmente as crianças, porém depois a incidência nesta faixa etária foi diminuindo relativamente, e agora o maior número de casos surge em adultos imunodeprimidos [25].

Entre 2005 e 2014, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, em Lisboa, foram detetados cerca de 119 novos casos de LV (*L. infantum*) com 17 detetados em adultos saudáveis, 36 em crianças e 66 em doentes imunodeprimidos. Foram também diagnosticados 16 casos de LC [25].

Em Madrid entre 2009 e 2012, 446 pessoas foram diagnosticadas com leishmaniose das quais 160 (35,9%) manifestaram a forma visceral e 286 (64,1%) a forma cutânea [26].

2.2 Leishmaniose canina

Os canídeos domésticos e selvagens são a principal espécie reservatária de *L. infantum* causadora de leishmaniose viscerocutânea nestes animais e principalmente de LV em seres humanos.[27]

São vários os fatores que contribuem para o cão ser o principal hospedeiro reservatório de *L. infantum*, nomeadamente:

- O carácter de infeção nestes animais tende a ser uma infeção crónica, permitindo a manutenção do parasita numa população animal durante bastante tempo;
- A carga parasitária presente na pele é usualmente elevada, facilitando o contacto do parasita com os vetores flebotomíneos [28];
- A fonte preferencial da refeição sanguínea do vetor é o cão [28];
- Existe uma elevada taxa de animais infetados, principalmente na bacia do Mediterrâneo, com cerca de 2,5 milhões de cães infetados entre Portugal, Espanha, França e Itália [28];
- Contato estreito entre cão doméstico e o homem [28].

Outras espécies de *Leishmania* já foram encontradas nos cães, embora nestes animais não sejam responsáveis por desenvolver doença. Porém levam a crer que o cão também possa servir de reservatório de infeção das mesmas. São exemplo dessas *L. panamensis* e *L. peruviana* [29].

Estudos de seroprevalência realizadas na principal região endêmica europeia, nomeadamente nas regiões limítrofes da bacia do Mediterrâneo, como Portugal, Espanha, França e Itália, estimaram que cerca de 2,5 milhões de cães domésticos (16,7%) apresentaram seropositividade a *Leishmania*, numa população canina de cerca de 15 milhões de animais [30].

Em Portugal existem três áreas consideradas como tradicionalmente endêmicas para LCan. No entanto, surgem bastantes focos de infeção em restantes zonas do país. Na região endêmica de Trás-os-Montes e Alto Douro verificou-se uma seropositividade de cerca de 21,3% em 654 animais testados [31]. Na região endêmica do Algarve verificou-se uma seropositividade de 16,1% em 193 animais testados [32]. Na região endêmica metropolitana de Lisboa verificou-se uma seropositividade de 19,2 % em 374 animais testados [33].

O número de animais infetados no continente europeu tem tendência a aumentar e são disso exemplo regiões que antes eram declaradas como não endêmicas e agora apresentam prevalências de infeção por *L. infantum* elevadas, como o caso do noroeste de Espanha. É também crescente a ocorrência de novos casos de LCan em regiões indemnes e sem a presença do vetor, como os Alpes, os Pirinéus, e o sul da Alemanha (19,34).

Como exemplo do aumento da prevalência de LCan destaca-se um estudo realizado na região da Galiza, noroeste de Espanha, nomeadamente na província de Ourense, onde foi detetada, em 2004, uma seroprevalência de *L. infantum* de 7,5% em 80 animais estudados, região até a essa data considerada indemne para a leishmaniose [35]. Um estudo posterior, realizado em 2011 na mesma região, detetou um aumento na seroprevalência, detetando-se positividade a anticorpos específicos de *Leishmania* em 35,6% dos 101 animais estudados [36].

O surgimento de novos casos em zonas classificadas como indemnes de leishmaniose explica-se devido às alterações climáticas que proporcionam melhores condições de desenvolvimento dos vetores flebotomíneos, bem como de melhores condições para a multiplicação de *Leishmania* no vetor invertebrado. O movimento e a visita dos animais a países endêmicos também contribuem para o aparecimento de focos de leishmaniose em zonas não endêmicas [19]. Um estudo realizado na Holanda estima que cerca de 58.000 cães são trazidos anualmente até à região do sul da Europa junto com os seus proprietários e que o risco de infeção por *L. infantum* destes animais está entre 0,027 a 0,23% [37].

Estão descritos alguns fatores que podem favorecer a suscetibilidade de infecção por LCan, nomeadamente a raça, idade e sexo [7].

Está descrita em cães uma predisposição racial, em que algumas raças como o Pastor Alemão, Boxer, Rottweiler, Cocker Spaniel apresentaram maior predisposição a infecção por *L. infantum*. Aparentemente, raças como Yorkshire Terrier e Poodle apresentam menor susceptibilidade à leishmaniose, porém a baixa incidência de LCan nestas raças também pode ser explicado devido a estes animais viverem mais em ambiente interior que exterior e consequentemente terem risco inferior de infecção [38].

Um estudo realizado nas ilhas Baleares, Espanha, revelou que a raça Podengo de Ibiza tinha uma predominância de imunidade celular no combate à infecção por *L. infantum* e consequentemente uma baixa prevalência dos animais desta raça em desenvolver manifestações clínicas de LCan [39].

A predisposição genética em animais suscetíveis está principalmente associada a mutações do gene *Slc11c1*, um gene codificante de uma proteína transportadora envolvido na ativação macrofágica e na resistência dentro dos fagolisossomas por parte de vários agentes infecciosos, entre os quais *Leishmania* [40].

Foi também verificado uma relação positiva entre a presença do gene DLA-DRB1*01502, envolvido na codificação de proteínas da classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHCII), e a suscetibilidade em sofrer de leishmaniose. Confirmou-se que animais com a presença deste gene, desenvolveram altos níveis de IgG específicas relacionadas com a imunidade humoral não protetora desta patologia, bem como mais facilmente apresentavam resultados positivos ao parasita no exame de PCR, comparativamente a animais em que não foi detetado este gene [41].

A predisposição à LCan associada à idade apresenta uma disposição bimodal, em que existem dois picos de prevalência em animais com idade inferior a 3 anos e outro pico em animais com mais de 8 anos [7]. Esta disposição bimodal pode explicar-se pelo carácter crónico da infecção por *L. infantum* em que os animais que desenvolvem sinais clínicos mais tarde podem ter contraído a infecção enquanto jovens mantendo-se controlados até que, por diversos motivos, entre os quais estados de imunodepressão ou doenças concomitantes, conduziram à expressão de LCan [38].

Os machos aparentemente demonstram ter maior suscetibilidade em desenvolver a doença em relação às fêmeas. Alguns estudos evidenciam que cerca de 60% dos animais infetados são machos (38,42). Não obstante que em ambos os estudos a maioria dos

animais intervencionados eram machos e que esta discrepância no género possa ser explicada deste modo.

Outros fatores como o comprimento do pelo dos animais, e subsequente a facilidade do vetor flebotomíneo realizar a sua alimentação sanguínea, também podem estar associados. Num estudo verificou-se que cães de pelo curto apresentaram níveis de seroprevalência mais elevados (37,6%) comparativamente a cães de pelo longo (20,9%) [43].

3. Transmissão

3.1 Hospedeiro invertebrado

Como já referido anteriormente, a leishmaniose é uma doença vetorial, em que apenas os flebótomos são aceites cientificamente como vetores do parasita, tanto para animais como para o homem [44].

Os flebótomos são insetos da ordem *Diptera*, da família *Psychodidae* e da subfamília *Phlebotominae*. Existem cinco géneros de flebotomíneos, dos quais se destaca o género *Phlebotomus*, vetores encontrados nos continentes europeu, africano e asiático, ou “Velho Mundo”; e o género *Lutzomyia*, responsável pela disseminação da doença no continente americano ou “Novo Mundo” São conhecidas sensivelmente 1000 espécies de flebotomíneos, das quais apenas 50 são vetoras de *Leishmania* spp[45].

Em Portugal, é conhecida a existência de cinco espécies diferentes de flebótomos, nomeadamente *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi* e *Sergentomyia minuta* [46].

P. ariasi, *P. perniciosus* e *S. minuta* são as espécies com maior abundância na região endémica de Trás-os-Montes e Alto Douro, sendo *P. ariasi* a espécie predominante (73,1% das espécies flebotomínicas capturadas). Estão também relatadas outras espécies de flebótomos, particularmente *P. perniciosus* (19,0%) e *S. minuta* (7,9%) [47]. Um estudo semelhante realizado no Algarve demonstrou que *P. perniciosus* é mais frequente nesta região (90,5% das espécies flebotomínicas capturadas) seguida de *S. minuta* (6,33%) e *P. ariasi* (0,84%) [48].

Apenas *P. perniciosus* e *P. ariasi* são espécies vetoras de *L. infantum*, a principal espécie responsável pela leishmaniose mediterrânica, sendo portanto as espécies flebotomínicas existentes no território nacional mais importantes na epidemiologia de leishmaniose [49].

Os flebotomíneos distribuem-se principalmente nas zonas tropicais e temperadas da Ásia, América, África, Austrália e sul da Europa. Geralmente, não ultrapassam os 50° de latitude norte e os 40° de latitude sul. Encontram-se também em regiões localizadas abaixo do nível do mar, como nas regiões limítrofes do Mar Morto, e até 3300 m de altitude, como nas regiões montanhosas do Afeganistão. Não está descrita a ocorrência de insetos flebotomíneos na Oceânia nem nas ilhas do Pacífico [50].

Geralmente, o ciclo de *P. perniciosus* dura cerca de 45 dias (47), embora a duração do ciclo seja fortemente condicionada por fatores climáticos como temperatura, humidade e fotoperíodo [50].

Em Portugal os adultos costumam surgir em Maio/Junho e têm atividade até Outubro/Novembro [46].

3.2 Morfologia e bioecologia do hospedeiro intermediário

Os flebótomos, ou “sand flies” como são vulgarmente denominados no idioma inglês, são insetos de pequenas dimensões, com cerca 3,5 mm, de cor cinzenta a acastanhada e corpo revestido por sedas que lhe conferem um aspeto felpudo característico [50].

As fêmeas para completarem o ciclo trofogónico e realizarem a ovipostura necessitam de ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado, nomeadamente de mamíferos, aves ou répteis. Contudo, existem algumas espécies em que as fêmeas executam a postura de ovos antes de realizarem uma refeição sanguínea, denominando-se como espécies autogénicas [44]. Algumas espécies, mais circunscritas às zonas tropicais, apresentam também propriedades partenogénicas no seu ciclo biológico, ou seja, realizam a postura de ovos sem necessitarem de fecundação por um flebótomo macho [51].

No geral, os flebótomos realizam voos curtos, de cerca de 300 m, e não se afastam muito dos locais de alimentação, ou seja, dos hospedeiros vertebrados. Não obstante, demonstrou-se que *P. ariasi* realiza voos de distância superior a 2 km [44]. A velocidade de voo do flebótomo é de cerca de 1 m/s, sendo mais lenta que a velocidade de voo de um mosquito. Outra característica de seu voo é o facto de o mesmo ser silencioso, também contrariamente ao voo dos mosquitos [50].

Na maioria das espécies, os flebotomíneos adultos apresentam maior atividade no período crepuscular e noturno, e apenas um número reduzido de espécies tem maior atividade durante o dia. Temperaturas compreendidas entre os 25 e 28°C, com humidade

relativa do ar moderada, são também condições ótimas ao desenvolvimento do ciclo dos flebótomos [49].

Durante os períodos de menor atividade, normalmente durante o dia, os flebótomos elegem como locais de repouso zonas abrigadas e húmidas. São disso exemplo refúgios de outros animais (casotas, tocas e estábulos), latrinas, fissuras nas paredes, rochas, solo, buracos nas árvores e entre vegetação densa. Normalmente, o local de ovopostura coincide com o local de repouso dos flebótomos [44].

Apenas os insetos flebotomíneos fêmeas participam na transmissão do parasita *Leishmania*, pois aquelas necessitam de ingerir uma refeição sanguínea, com o intuito de completar o ciclo trofogónicos. As fêmeas quando infetadas por *Leishmania* spp. são capazes de inocular o parasita durante toda a sua vida. É estimado que *P. ariasi* sobreviva durante cerca de 29 dias e *P. perniciosus* cerca de 31 dias[45].

As larvas dos flebotomíneos alimentam-se de matéria orgânica em decomposição animal ou vegetal, com preferência por locais húmidos como tocas de roedores e fissuras nas paredes e muros, sendo assim o controlo difícil [50].

Espécies como *P. ariasi* são exofílicas (vivem no exterior) e zoofílicas, ou seja, tem preferência por ambientes silváticos ou exteriores e os hospedeiros vertebrados preferenciais para a sua refeição sanguínea são animais silváticos e domésticos, nomeadamente raposa, cão, lobo e roedores. *P. papatasi* e *P. perniciosus* classificam-se como espécies endofílicas, pois têm preferência pelos habitats peridomésticos e domésticos, aumentando assim o risco de infeção dos animais domésticos, como o cão e o gato, bem como o risco de infeção humana, dado que *P. perniciosus* é também zooantropofílico, ou seja, ingere as suas refeições sanguíneas tanto em animais como em humanos [49].

Das várias espécies de flebótomos existentes, poucas são as que têm competência vetora. Para atuarem como vetores tem que satisfazer alguns critérios, tais como ter contacto e preferência em se alimentar no hospedeiro reservatório, nomeadamente no cão. Devem permitir o desenvolvimento biológico de *Leishmania* spp., nomeadamente apresentarem condições para as formas promastigotas se ligarem a recetores específicos no intestino para que desta forma não sejam expelidas juntamente com as fezes do flebótomo [44].

O flebótomo tem de ter a capacidade de transmitir o parasita após realizar uma nova refeição sanguínea num novo hospedeiro. Esta transmissão ocorre principalmente

através da perturbação da válvula estomodeal, que permite a libertação das formas promastigotas metacíclicas para o local da picada onde o flebótomo se alimenta [49].

Outro fator adjuvante na transmissão de *Leishmania* ao hospedeiro vertebrado é o facto de a saliva do flebótomo possuir vários compostos com propriedades vasodilatadoras, anticoagulantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Desta maneira aumenta a capacidade de disseminação de *Leishmania* spp., promovendo-se uma modificação da resposta imunitária do hospedeiro definitivo no sentido de estimular a imunidade humoral, não protetora da infeção por *Leishmania* spp. [44].

O vetor alimenta-se de modo telmofágico, que consiste na inserção das suas peças bucais cortantes na pele do hospedeiro vertebrado, sendo depois estas agitadas de forma vigorosa e provocando lesões na pele, como micro-hematomas, formando-se o charco hemolinfático, do qual o sangue é sugado e ingerido [52].

A atividade das peças bucais do flebótomo e respetiva lesão causada provoca uma resposta inflamatória no hospedeiro vertebrado, havendo recrutamento de células inflamatórias, como macrófagos, células de Langerhans e células dendríticas, facilitando assim o estabelecimento da infeção em animais suscetíveis e tornando os flebótomos como parte integrante na patogenia da leishmaniose [50].

As formas amastigotas, uma vez no intestino do flebótomo, iniciam processos de desenvolvimento e multiplicação que culminam em cerca de 6 a 10 dias com a geração das formas promastigotas metacíclicas, sendo estas as formas infetantes para o hospedeiro vertebrado [28].

A forma amastigota começa a alterar a sua estrutura morfológica, alongando-se e adquirindo flagelo na porção anterior conferindo-lhe alguma mobilidade. Esta forma denomina-se como promastigota procíclico, e é também a primeira forma parasitária no hospedeiro invertebrado que tem capacidade de divisão celular [53].

Após alguns dias estas formas promastigotas procíclicas abrandam o ciclo replicativo e começam a diferenciar-se em formas nectomonadais [54]. Estas continuam a sua progressão anterior e ao chegarem próximo da válvula estomodeal mudam para a forma de leptomonas, cuja estrutura celular é mais pequena e tem capacidade de multiplicação, iniciando o segundo ciclo de replicação parasitária no hospedeiro invertebrado [53].

Entre 5 a 7 dias após a refeição sanguínea, as leptomonas fixam-se à parte cuticular da válvula estomodeal e transformam-se em haptomonas. Algumas das formas haptomonadais, sofrem depois uma última transformação em promastigotas metacíclicas,

sendo esta a última diferenciação parasitária, bem como é a única forma capaz de infectar o hospedeiro vertebrado [54].

3.3 Outros potenciais vetores

Embora, atualmente, os flebótomos sejam os únicos vetores biológicos de *Leishmania* spp. aceites na comunidade científica, [44] põe-se a possibilidade de outros artrópodes atuarem como vetores, nomeadamente ectoparasitas como as pulgas e as carraças. Questiona-se esta hipótese, pois em alguns locais onde a leishmaniose não é endémica, existe baixa percentagem de infeção por *Leishmania* spp. nos flebótomos (cerca de 1%) ou existe transmissão autóctone sem a presença do vetores flebotomíneos na região [55].

Os ixodídeos têm grande potencial vetorial uma vez que apresentam: 1) elevado potencial biótico, 2) vários estádios larvares necessitando de uma refeição sanguínea num novo hospedeiro para executar a muda, 3) elevada resistência e longa duração no meio ambiente bem como alta densidade populacional (56,57). Estes ectoparasitas são capazes de transmitir vários agentes infecciosos, nomeadamente bactérias, protozoários, vírus e nematodes.

Alguns estudos revelaram a deteção de segmentos de ADN de *Leishmania* spp. em carraças retiradas de cães previamente diagnosticados com leishmaniose. Solano-Gallego et al. [58] revelaram num estudo uma positividade de infeção por *Leishmania* spp. de cerca de 10,1 % em 128 adultos de *Rhipicephalus*. Salvattore et al. [59] num estudo em que utilizaram 119 carraças da espécie *Ixodes ricinus*, removidas de cães e gatos, verificaram que 7,5% destas apresentavam positividade para a presença de ADN de *Leishmania*.

Outro facto detetado por Solano-Gallego et al. [58] foi uma alta positividade em machos de *Rhipicephalus*, bem como a sua extração principalmente em cães seronegativos para *Leishmania*, o que demonstra uma infeção prévia e que depois buscam um novo hospedeiro, ao qual podem potencialmente transmitir o parasita [58].

Um estudo realizado por Dantas-Torres et al.[60] comprovou também a existência de segmentos de ADN na descendência das fêmeas, ao realizar um estudo por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, analisando a existência de ADN de *Leishmania* spp., nas carraças fêmeas, ovos e suas larvas. Tal facto comprovou a transmissão transovárica e transestadica de *Leishmania* em *R. sanguineus* [61]. Este

estudo também revelou a existência de ADN de *Leishmania* 4 meses após a detecção da infecção e, tendo em conta que o ADN de *Leishmania* é destruído muito rapidamente, provavelmente os parasitas continuaram viáveis (60,62).

Dantas-Torres et al. [63] comprovaram também a existência de ADN nas glândulas salivares de *R. sanguineus*, o que ajuda a sustentar a hipótese do potencial destes agentes em atuarem como vetores de leishmaniose, pois durante a sua alimentação é segregada grande quantidade de saliva para o local de inoculação [63].

A detecção de ADN de *Leishmania* em carraças como *Ixodes ricinus* ou *R. sanguineus* não comprova a capacidade vetorial destes agentes, pois as leishmânias ingeridas podem morrer e não ter atividade. No entanto, num estudo levado a cabo por Colombo et al. [64] detetou-se a existência de ARN de *Leishmania* spp., significando que existe transcrição ativa por parte do parasita e consequentemente sua viabilidade (60).

Com estes dados, pode-se assumir que são ainda necessários novos estudos, no sentido de averiguar o desenvolvimento de *Leishmania* nestes hospedeiros invertebrados e do modo como estes agentes conseguem intervir na transmissão. No entanto, não se deve descuidar os fatos recentemente encontrados e o potencial vetorial destes ectoparasitas.

3.4 Transmissão não vetorial

O surgimento de casos autóctones de leishmaniose em zonas onde a leishmaniose não é endémica e onde não é conhecida a existência do vetor desencadeou o surgimento da hipótese de transmissão não vetorial, nomeadamente através de transfusões sanguíneas provenientes de animais infetados, mordeduras entre cães, transmissão venérea e transmissão vertical (7,55,65).

O aparecimento de casos de leishmaniose, em regiões com ausência de registos de incidência desta doença pode também dever-se ao fato de alguns dos animais terem proveniência em regiões endémicas, como a bacia do Mediterrâneo, ou por terem se terem deslocado e permanecido temporariamente nessas regiões e consequentemente a infecção ter ocorrido nesses locais [55].

Porém, não se pode descuidar o fato de que alterações climáticas e geográficas poderem conduzir a alterações das condições de nidificação e desenvolvimento dos vetores de *Leishmania* spp., os flebótomos, e com isto zonas antes não endémicas terem condições para a doença se estabelecer como endémica [55].

No entanto, em alguns locais, surgiram focos de infecção em animais que nunca saíram de um território livre da doença e onde não está registada a existência de vetores flebotomíneos, nomeadamente no sul da Alemanha e Holanda (55,66).

3.5 Transmissão vertical e venérea

Vários estudos comprovaram ser possível a transmissão de *L. infantum* das cadelas para a sua descendência. Este fato também explica o surgimento de focos de leishmaniose em zonas geográficas onde não existe o vetor (55,66). A transmissão venérea, ou através da cópula, está também descrita e provada. É um fato que se deve ter em conta por criadores de canídeos, principalmente em zonas endémicas (55,65,67).

3.6 Transmissão por transfusão sanguínea

Como já referido, esta hipótese ganha força devido ao aparecimento de casos autóctones em zonas sem registo de existência do vetor.

Pode ocorrer transmissão através de transfusões sanguíneas, uso de seringas entre animais infetados e sãos, e também através de mordeduras entre cães. No entanto, esta última hipótese ainda carece de informação científica que prove esta via de transmissão [7].

A transmissão através transfusões sanguíneas realizadas a partir de animais infetados é importante, pois algumas medidas no controlo desta doença foram adotadas, nomeadamente o controlo da positividade da doença para animais sujeitos a recolha de sangue para ser armazenado em bancos [7].

A seleção de animais para doadores de sangue implica a realização de um teste serológico quantitativo prévio, e os animais seropositivos a leishmaniose são excluídos [7].

Os animais que apresentam resultado negativo neste teste são também sujeitos a testes moleculares, nomeadamente a PCR. Idealmente devem ser analisadas várias amostras de tecido, no sentido de conferir mais sensibilidade ao teste. De preferência devem ser sujeitas a PCR amostras de medula óssea e/ou linfonodos, no sentido de aumentar a sensibilidade do teste [7]. Cada lote de sangue individual também deve ser alvo de análise por PCR.

4. Patogenia

Após as formas promastigotas metacíclicas serem inoculadas na pele, desenvolve-se uma resposta imunitária, não só devido às formas parasitárias como também devido à acção das substâncias vasoativas e imunomoduladoras, presentes na saliva do flebótomo. Esta resposta imunitária traduz-se no recrutamento de várias populações celulares de primeira linha, ou imunidade inata, entre as quais sobressaem-se os neutrófilos, macrófagos, células “natural killer” (NK), células dendríticas e células de Langerhans [68].

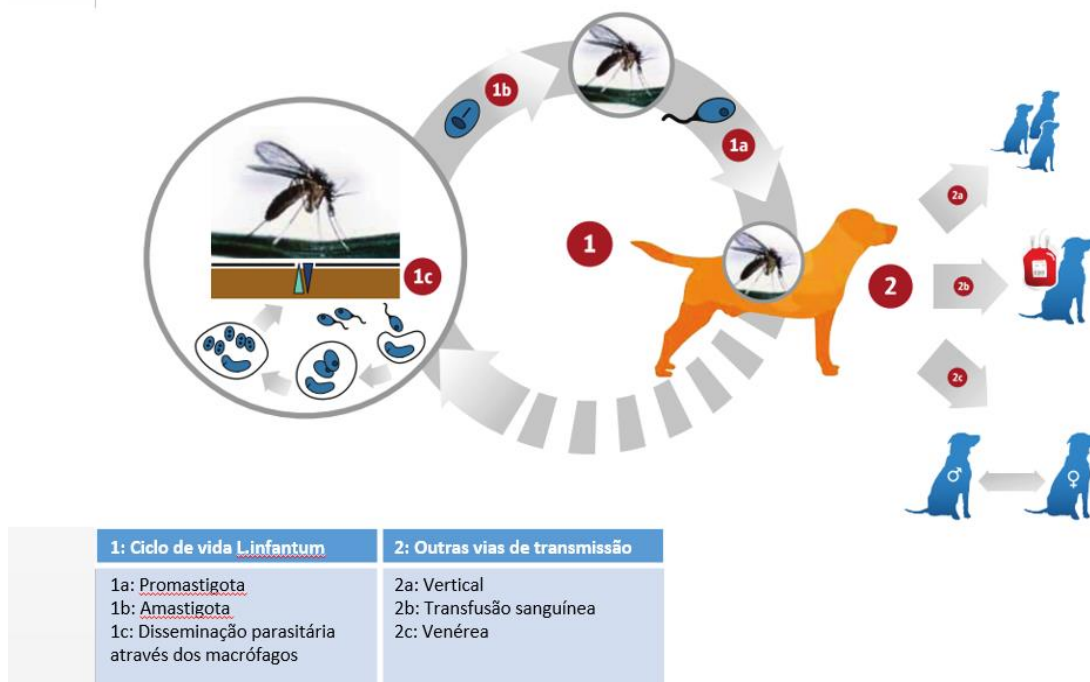


Figura 3: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. 1: Ciclo parasitário; 2: Vias transmissão

4.1 Imunidade inata

Pouco se sabe da real função que os neutrófilos têm na patogenia de *Leishmania*. No entanto, estas são das primeiras células a chegar ao foco inflamatório produzido pela picada do flebótomo [69]. O recrutamento de neutrófilos parece ser exacerbado através de um fator quimiotático produzido pelos próprios promastigotas metacíclicos (fator quimiotático de *Leishmania*, LCF – “*Leishmania* chemotactic factor”) inoculados na pele do hospedeiro vertebrado [70].

No foco inflamatório as promastigotas são fagocitadas pelas células neutrofílicas, e provocam mecanismos que culminam com a apoptose destas células, recrutando

macrófagos ao foco necrótico, sendo estas as principais células-alvo de *Leishmania*. Esta denomina-se como teoria do “cavalo de Troia” [69].

As células NK também se incluem nas células inflamatórias de primeira linha, ou imunidade inata, tal como os neutrófilos/macrófagos. Estas células estão associadas a resposta imunitária protetora frente a *Leishmania*, pois produzem as citocinas inflamatórias IFN- γ e FNT- α , associadas a este tipo de imunidade [71].

Outras células que participam na patogenia e evolução da doença são as células dendríticas, nomeadamente as células de Langerhans [72]. Estas são células apresentadoras de antígeno (CAP) através dos complexos de proteínas MHCII, e transportam as leishmânias até ao linfonodo regional com o intuito de estimular os linfócitos T. Consoante o animal seja suscetível ou resistente, será estimulada a população linfocitária CD4+ Th2 ou Th1, respectivamente [73].

As últimas células pertencentes à imunidade inata que faltam referir são os macrófagos. Estas são as células têm funções importantes na fagocitose de diversos microrganismos patogénicos, produzem diversas citocinas inflamatórias e têm também funções de CAP. São também as principais células-alvo das formas parasitárias de *Leishmania* [68].

Os macrófagos são recrutados até ao local de inoculação devido a vários mecanismos inflamatórios, já referidos, com o intuito de fagocitar as formas promastigotas metacíclicas. Após fagocitadas, as mesmas usam mecanismos de resistência fagocitária através de várias moléculas, nomeadamente através de duas moléculas como o lipofosfoglicano e uma protease de superfície (GP63) [73]. A principal função do lipofosfoglicano, nesta parte do ciclo parasitário, é atrasar a fusão do fagossoma com o lisossoma, importante para a diferenciação do promastigota em amastigota [74]. Após esta diferenciação o fagossoma já se consegue unir com o lisossoma e forma-se o fagolisossoma, local onde existe a multiplicação das formas amastigotas por fissão binária [73]. Estas formas conseguem resistir e multiplicar-se neste local por diversos mecanismos entre os quais a inibição de certas enzimas líticas produzidas pelos macrófagos, principalmente a enzima responsável pela produção de óxido nítrico (iNOS) [74].

Esta multiplicação parasitária conduzirá posteriormente à lise dos macrófagos infetados, e subsequente libertação das formas amastigotas, que irão novamente ser fagocitadas por outros macrófagos e neutrófilos [68]. Nos animais resistentes à infeção, as formas parasitárias geralmente não se disseminam além do linfonodo regional,

enquanto em animais suscetíveis as formas amastigotas prosseguem a disseminação até vários órgãos, tais como o fígado, medula óssea, baço, linfonodos e rins [75].

4.2 Imunidade específica e adquirida

A suscetibilidade e resistência à infecção por *L. infantum*, será influenciada pelo caráter da imunidade específica ou adquirida, conduzida pelo hospedeiro vertebrado, ou seja Existem duas populações linfocitárias principais: os linfócitos B, produtores de anticorpos, e os linfócitos T. Os linfócitos T, de especial interesse no âmbito da patogenia da LCan, podem-se dividir principalmente consoante os seus recetores em linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ ou citotóxicos [76].

A principal população celular responsável por conferir resistência ou permitir suscetibilidade à infecção por *L. infantum* será a população celular Th CD4⁺. Sabe-se que numa resposta imunitária protetora contra a infecção existirá um predomínio de células linfocitárias T CD4⁺ Th1, indutoras de imunidade celular protetora, e numa resposta imunitária ineficaz a população linfocitária predominante serão os linfócitos T CD4⁺ Th2, indutores da imunidade humoral não protetora [75].

Não obstante, estudos demonstram que animais infetados com *L. infantum*, aparentemente saudáveis ou doentes, demonstram um padrão imunitário misto com ambas as populações linfocitárias (Th1 e Th2) [77]. No entanto, uma das populações celulares sobrepõe-se em relação à outra [75] e é este equilíbrio entre as mesmas que irá conduzir à progressão da doença e respetivos sinais clínicos ou à cura e ao controlo da multiplicação e disseminação parasitária [78].

Na resposta imunitária celular, eficaz e protetora contra a infecção por *L. infantum*, é selecionada a população linfocitária dos linfócitos Th1 que produzem as citocinas IL-2, IL-12, IFN- γ e FNT- α . Destas o IFN- γ assume-se como a molécula mais importante associada à resistência, pois estimula capacidade de destruir as formas parasitárias intramacrofágicas, juntamente com o FNT α [79]. Esta ativação macrofágica induz principalmente a formação de óxido nítrico, a principal molécula envolvida na destruição das formas amastigotas intramacrofágicas [6].

Além da população linfocitária CD4⁺ Th1, também os linfócitos T CD8⁺ aparentam ter um papel importante na resistência à LCan, pois lisam diretamente os macrófagos infetados [23].

A resposta protetora traduzir-se à na ausência de manifestações clínicas, baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, baixa carga parasitária e resposta positiva no teste interdérmico de hipersensibilidade retardada a antígenos de *Leishmania* na pele (HTR) [79].

Os animais suscetíveis à infecção e doentes terão uma predominância da população celular dos linfócitos Th2, que produzem as citocinas, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- β (Fator de transformação do crescimento beta) (6,11,80). O TGF- β é uma citocina que possui uma forte função regulatória e supressora do sistema imunitário, nomeadamente na supressão do desenvolvimento dos linfócitos Th1 e Th2, como também inibe a síntese de IFN- γ e NOS2 e subsequente capacidade leishmanicida por parte dos macrófagos [81].

A IL-10 tem funções inibitórias sob a diferenciação da resposta Th1 [78], bem como na ativação e atividade macrofágica, ao inibir a enzima iNOS e com isto a capacidade leishmanicida dos macrófagos infectados. Efeito semelhante também aparenta ser desencadeado pela IL-4 [80].

Nos animais suscetíveis, os linfócitos Th2, em resposta a uma contínua estimulação antígenica do sistema imunitário por parte de *Leishmania*, são responsáveis pela ativação policlonal e monoclonal dos linfócitos B e plasmócitos [6], que respondem com uma excessiva produção de imunoglobulinas, nomeadamente IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA e IgE (10,68,82) (Figura 4).



Figura 4: Principais diferenças imunológicas entre animais infectados sintomáticos e assintomáticos. Adaptado de [137]

Esta excessiva produção de anticorpos é responsável pela maioria dos sinais clínicos manifestados num paciente suscetível à LCan, principalmente pela manifestação

de dois fenómenos de reações de hipersensibilidade, nomeadamente de tipo II e tipo III (reação de D'Arthus). Na primeira reação, a excessiva produção de anticorpos, pode causar a formação de autoanticorpos, que irão reagir com células do próprio organismo nomeadamente plaquetas, eritrócitos e outras células, originando fenómenos de anemia e trombocitopenia imunomediadas (10,68).

A reação de hipersensibilidade de tipo III é responsável pela produção e libertação de grandes quantidades de imunocomplexos circulantes, que se irão depositar em vários tecidos conduzindo à ativação do complemento e subsequente reação inflamatória nos tecidos onde se depositam. Desta reação inflamatória resultam lesões como vasculites, glomerulonefrite, poliartrites e uveítes [10].

Um animal afetado apresentará elevados níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, nomeadamente de IgG2 [8], hipergamaglobulinémia, baixo número de linfócitos T circulantes, ausência das citocinas IL-2 e IFN γ e ausência de resposta ao teste de HTR por estimulação com antígenos de *Leishmania* [79].

A imagem histopatológica típica num animal infetado é de uma inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa, localizada em diversos tecidos, caracterizada por uma infiltração e proliferação de macrófagos, histiócitos, plasmócitos e linfócitos [77].

Esta imagem é frequente em tecidos como os linfonodos, medula óssea, baço, fígado, intestino, tecido ósseo, aparelho reprodutor masculino e em lesões em mucosas [6].

5. Sinais clínicos:

As manifestações apresentadas pelos animais suscetíveis são muito variadas podendo apresentar-se desde uma simples dermatite papular, geralmente no local de inoculação, até a uma afeção sistémica comprometendo gravemente o estado sanitário do animal, principalmente devido a disfunção renal, geralmente de desfecho fatal [77] (Figura 5). O período de incubação da LCan pode variar entre 3 meses e 6 anos, pelo que desde o momento da infeção até ao desenvolvimento de alterações pode decorrer bastante tempo [75].

Como já referido, muitos fatores predisponentes condicionam a evolução e tipo de manifestações apresentadas num animal infetado por *L. infantum*, mas geralmente as manifestações mais frequentemente apresentadas são a perda de condição corporal, atrofia muscular generalizada, linfadenomegalia, intolerância ao exercício, letargia,

anorexia, esplenomegalia, lesões dermatológicas, polidipsia/poliúria, epistaxis, lesões oculares, onicogrifose, vômitos, diarreia e febre [83] (Tabela 1).

Tabela 1: Percentagem de ocorrência dos sinais clínicos mais frequentemente apresentados nos animais com LCan clínica. Adaptado de [78]

Sinais clínicos mais frequentemente apresentados nos animais com LCan clínica	Percentagem de ocorrência
Lesões cutâneas	81% - 89%
Linfadenomegália	62% - 90%
Lesões oculares	16% - 81%
Palidez das mucosas	58%
Esplenomegália	10% - 53%
Caquécia	10% - 48%
Febre	4% - 36%
Hemorragia nasal (epistaxe)	6% - 10%
Onicogrifose	20% - 31%

5.1 Lesões dermatológicas

As lesões dermatológicas associadas à LCan encontram-se em cerca de 80 a 90% dos casos apresentados à consulta[6], sendo bastante variáveis desde uma lesão nodular no local da picada do flebótomo, localizada normalmente no nariz e no pavilhão auricular denominando-se de “cancro de inoculação”, até lesões cutâneas mais difusas como:

- Dermatite descamativa seca não prurítica (lesão muito sugestiva de LCan) [75];
- Lesões ulcerativas, geralmente nas extremidades auriculares, saliências ósseas (asas do íleo) e junções mucocutâneas [6];
- Dermatite proliferativa mucocutânea [83];
- Dermatite papular [77];
- Alopecia periorbital, conferindo aspeto de lunetas [42];
- Onicogrifose [6];
- Alopecia e hiperqueratose [75];
- Despigmentação, normalmente nasal [6].

A ocorrência de pioderma profundo ou superficial, geralmente por *Staphylococcus* spp. constitui muitas vezes uma complicação secundária [83].

A análise histopatológica das lesões, geralmente revela a presença de inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa, podendo ter várias distribuições nomeadamente perivascular, intersticial, nodular ou periadnexal, sendo possível por vezes a extensão das mesmas para o pânículo cutâneo [6].

5.2 Linfadenopatia

Ocorrência em cerca de 62 a 90% dos animais, apresentando algumas vezes uma hipertrofia local, mas na maioria dos casos ocorre uma linfadenomegália generalizada [78]. Os linfonodos apresentam-se hipertrofiados e duros à palpação [75].

Esta hipertrofia é causada por um aumento do número e tamanho dos folículos linfóides, bem como devido a uma hiperplasia e hipertrofia dos macrófagos medulares [78]. Geralmente os linfonodos mais afetados são o pré-escapular e o poplíteo [75].

5.3 Lesões renais

As lesões renais são a principal causa responsável pelo desfecho fatal da infeção por *L. infantum* nos cães [75] e estão presentes em praticamente todos os animais com LCan, quer tenham infeção clínica ou subclínica. Na análise histopatológica, 91% dos animais apresentam glomerulonefrites, enquanto 78% apresentam lesões tubulointersticiais [78]. Alguns estudos demonstram que quase todos os animais infetados, quer estejam fisicamente doentes ou não, apresentam alterações histopatológicas no tecido renal [75]. As alterações renais, por vezes podem ser a única manifestação clínica num animal com LCan [77].

As lesões renais evidenciadas num paciente com LCan variam desde uma ligeira proteinúria em animais subclínicamente infectados até a uma síndrome nefrótica ou urémica, geralmente de desfecho fatal [77]. Num animal clinicamente afetado ocorre uma extensa reação inflamatória humoral, caracterizada por um excesso de produção de anticorpos não protetores, permitindo a multiplicação e disseminação de *Leishmania*, e como tal um aumento de antígenos de *Leishmania* circulantes. Este fenómeno é responsável pela formação dos imunocomplexos circulantes, que se depositam entre outros tecidos, no glomérulo renal, e causam uma extensa resposta inflamatória, sob o intuito de remover estes imunocomplexos. No entanto, esta resposta é bastante lesiva para o glomérulo, especialmente devido à libertação de enzimas líticas por parte dos neutrófilos [84]

A lesão glomerular manifesta-se sobretudo por aumentar as perdas de proteína na urina, que nos animais aparentemente saudáveis pode ser a única alteração clinicopatológica apresentada [77]. Como tal, a avaliação da proteinúria é aconselhada em todos os animais infectados [75]. A proteinúria constante nestes animais pode explicar a atrofia muscular e a caquexia [77]. Apesar de a maioria dos animais infetados com LCan apresentarem lesões renais, a azotemia apenas é evidente nos animais com doença avançada, pois esta só ocorre após a maioria dos nefrónios estarem afetados [6]. Outra complicação das lesões renais da LCan é o fato de a nefropatia proteinúrica crónica conduzir a alterações da excreção glomerular, bem como ao desenvolvimento de hipertensão sistémica, que conduz à perpetuação das lesões [77].

Como tal, torna-se importante em todos os animais diagnosticados com LCan avaliar a função renal, bem como determinar o estadiamento da possível lesão renal instalada, segundo as recomendações da IRIS.

5.4 Lesões oculares

As lesões oculares representam entre 16 a 81% das lesões manifestadas na LCan [78] e podem apresentar-se como sendo a principal lesão num animal com LCan em 3,7-16% dos animais [77]. Incluem principalmente uveíte anterior, queratite, blefarite, conjuntivite e combinações entre as mesmas [75].

Estas lesões têm diferentes mecanismos histopatológicos, nomeadamente:

- Inflamação granulomatosa local por presença de agentes parasitários, responsável por blefarites e conjuntivites;
- Deposição de imunocomplexos circulantes na úvea, originando uveíte [85];
- Inflamação de estruturas oculares adjacentes, como por exemplo queratoconjuntivite seca devido a inflamação das glândulas lacrimais e conjuntivite secundária a blefarite [6];
- Repercussões de alterações sistémicas como a hipertensão arterial originando descolamento da retina [83];

Estas lesões em estados avançados, por vezes podem culminar na existência de glaucoma e panoftalmite[75]. Outras lesões, embora mais raras, também podem ocorrer, nomeadamente cataratas, celulite periorbital e esclerite granulomatosa [77].

5.5 Lesões no sistema locomotor

5.5.1 Tecido muscular

São frequentes as alterações da locomoção nos animais infetados por LCan. Um estudo demonstrou que cerca de 45% dos animais revelaram alterações na marcha [78]. Têm diversas origens, nomeadamente no tecido muscular (miosites), tecido nervoso (paresia, neuralgia) e no tecido ósseo e articulações [75].

As lesões musculares existentes nos animais com LCan são sobretudo devidas a polimiosites crónicas, que estão presentes tanto em animais doentes como aparentemente saudáveis e manifestam-se sobretudo pela atrofia muscular progressiva [86]. Têm como mecanismos patológicos subjacentes a existência de um infiltrado inflamatório linfoplasmocitário devido à presença de formas amastigotas de *Leishmania* no tecido muscular, deposição de imunocomplexos nas miofibrilas, vasculite neutrofílica e presença de auto-anticorpos [78].

A atrofia muscular inicia-se primariamente nos músculos mastigadores, nomeadamente nos músculos temporais, e continua progressivamente pela restante musculatura esquelética [86]. A atrofia dos músculos mastigadores dá a aparência típica de “cabeça de velha”[75]. A atrofia da restante musculatura, nomeadamente a musculatura esquelética dos membros, contribui para a claudicação e intolerância ao exercício evidenciada em alguns animais [77].

5.5.2 Ossos e articulações

As alterações nestes tecidos estão também estreitamente relacionadas com as alterações na locomoção, cuja patogenia envolve dois mecanismos, nomeadamente um através do qual as formas amastigotas de *Leishmania* têm uma ação direta na membrana sinovial, originando uma reação inflamatória granulomatosa neste local [77], e outro que resulta na deposição de imunocomplexos circulantes, na membrana sinovial resultando na reação de hipersensibilidade tipo III com respetivo recrutamento neutrofílico. Estas células são responsáveis pela libertação das suas enzimas líticas resultando na destruição da membrana [87].

As lesões nas articulações geralmente são bilaterais e simétricas e classificam-se como sendo erosivas ou não erosivas [6]. Geralmente são não erosivas e podem estar, associadas a sinovite, sendo que com esta condição associada apresentam um edema e aumento de temperatura da articulação [88]. Alguns estudos sugestionam que a forma não

erosiva relaciona-se com a forma subaguda da doença, enquanto a forma erosiva se relaciona com a fase aguda de LCan [87].

No tecido ósseo são evidenciadas lesões osteolíticas e osteoproliferativas, usualmente nos ossos longos, e são resultado de inflamação granulomatosa [77]. Os ossos afetados frequentemente apresentam lesões proliferativas no periósteo e na medula óssea, bem como osteólise cortical e medular [78].

5.6 Lesões hemorrágicas

A hemorragia nasal ou epistaxe é a lesão hemorrágica mais frequente nos cães com LCan. As lesões hemorrágicas são a segunda causa principal de morte nos cães doentes, sendo a insuficiência renal crônica a principal causa de morte associada a esta patologia [75]. Além de epistaxe, também hematúria e diarreia hemorrágica podem ocorrer nos animais com LCan [78]. Estas lesões devem-se principalmente a trombocitopenia, aumento da viscosidade do soro por hiperblobulinemia e devido a inflamação nasal que pode ser acompanhada por ulceração e vasculite, devido à presença de formas amastigotas de *Leishmania* [6]. No entanto, pensa-se que a maioria das lesões hemorrágicas na LCan resulta de inflamação das mucosas, acompanhada ou não de lesões ulcerativas, em detrimento de alterações hemostáticas [77].

5.7 Alterações hematológicas

As alterações hematológicas mais frequentes são respetivamente anemia e trombocitopenia. Destas a anemia é mais frequente e tem diversas causas, tais como perdas sanguíneas em lesões hemorrágicas; hemólise causada pela produção de autoanticorpos e deposição de imunocomplexos nas membranas dos eritrócitos; e diminuição da eritropoiese bem como por possível coexistência de outras infeções. A trombocitopenia na LCan tem o mesmo mecanismo fisiopatológico subjacente, mas não costuma ser tão evidente em comparação com a anemia [6].

5.8 Aparelho reprodutor

Geralmente as lesões no aparelho reprodutor em LCan são encontradas em machos, pois *L. infantum* não manifesta ter tropismo para este aparelho na cadela. As lesões mais comumente encontradas são orquites, epididimites e prostatites crônicas, responsáveis pelo aparecimento de hematospermia e teratozoospermia, ou seja, presença

de eritrócitos no sémen e alterações morfológicas dos espermatozóides. São também encontradas balanopostites e inflamações granulomatosas penianas [77].

5. 9 Lesões digestivas

As lesões no sistema digestivo encontram-se sobretudo no intestino e no fígado e têm como patofisiologia subjacente uma reação granulomatosa/piogranulomatosa devido à presença do parasita nestes locais (6,77). As lesões intestinais encontram-se principalmente no cólon e manifestam-se sob a forma de colites crónicas, sendo responsáveis por diarreias crónicas, como também podem ter caráter subclínico [6]. Estudos demonstraram que a carga parasitária é maior nos segmentos intestinais do ceco e cólon, embora todos os segmentos do trato gastrointestinal são passíveis de conter formas amastigotas de *Leishmania* [89].

As lesões hepáticas são frequentemente encontradas, embora na maioria das vezes não tenham expressão clínica, mas podem contribuir para algumas condições clínicas associadas à LCan, nomeadamente ter um papel adjuvante no estabelecimento da hipoalbuminemia, bem como nas alterações dos parâmetros bioquímicos de avaliação da função hepática (6,77).

Na análise histopatológica destas lesões, evidenciam-se principalmente três padrões histológicos, pressupondo-se uma relação entre os três padrões e a progressão da doença hepática. Num primeiro padrão histológico não se evidenciam alterações na arquitetura hepática, não obstante observa-se um aumento do número de macrófagos nos sinusoides. Num grau mais grave de afeção hepática, a análise histopatológica revela uma extensa infiltração linfoplasmocitária na zona da tríade portal, sinusoides e eventualmente no restante parênquima [90]. O grau de fibrose hepática correlaciona-se positivamente com a carga parasitária, estado clínico do animal e as alterações degenerativas no parênquima hepático [77].

5.10 Lesões cardiovasculares

Estas alterações são pouco frequentes e estão descritas lesões não supurativas no miocárdio, pericardite fibrinosa e pneumonia [77]. Em pacientes com disfunção glomerular grave e que apresentam síndrome nefrótica, podem também por vezes serem encontradas lesões tromboembólicas [88].

5.11 Outros órgãos: baço, sistema nervoso central e mucosa oral

A esplenomegália é um dado relativamente frequente em animais com LCan. No entanto, este aumento orgânico geralmente, não se manifesta de modo suficiente para que se consiga detetar por palpação abdominal [6]. A esplenomegalia resulta devido à infiltração de macrófagos e monócitos bem como a alterações estruturais tais como o aumento de veias e vénulas da pulpa e aumento das fibras reticulares [78]. Alguns autores sugerem que este órgão desempenha um papel relevante na sobrevivência de *Leishmania* nos animais suscetíveis, após instituição de protocolos terapêuticos [6].

Embora raras, estão também descritas alterações do sistema nervoso central (SNC) em alguns animais com LCan, geralmente provocadas por reação inflamatória granulomatosa devido à presença do parasita no SNC, hemorragias espinais, vasculites e enfartes cerebrais (77,91). Estas lesões podem ter como manifestações clínicas associadas a alterações comportamentais, convulsões, paraplegia, rigidez e dor no pescoço (6,77).

As lesões na mucosa oral associadas a *Leishmania* são também pouco frequentes e, quando presentes, manifestam-se principalmente sob a forma de nódulos e pápulas na língua e lesões ulcerativas que podem estar dispersos por toda a cavidade oral (77, 95). Estas lesões são provocadas pela migração de macrófagos infetados secundariamente a traumas na cavidade oral como também podem advir da ingestão acidental de flebótomos infetados [6].



Figura 5: Manifestações clínicas de LCan.

1 - Caquexia; 2 - Dermatite esfoliativa com descamação; 3 - Placa ulcerada no queixo; 4 - Onicogribose; 5 - Blefarite e OCS; 6 - Atrofia dos músculos mastigadores.

6. Diagnóstico

Como já referido, a LCan apresenta um espectro muito variável e inespecífico de sintomatologia clínica e alterações clinicopatológicas, tornando o diagnóstico complexo [83]. O diagnóstico de LCan pode-se realizar usando tanto métodos diretos como indiretos. Os principais métodos de diagnóstico direto são a avaliação citológica, avaliação histológica, cultura do parasita, análise de PCR e xenodiagnóstico. Os métodos de diagnóstico indireto são o exame serológico e avaliação da resposta imunitária celular ou humoral (93,94). Os procedimentos de diagnóstico são executados principalmente em duas situações; quando os animais apresentam alterações compatíveis com LCan, e para pesquisa de infecção em animais aparentemente saudáveis [95].

6.1 Métodos não específicos

O primeiro passo começa pela obtenção de uma história clínica exaustiva do animal, nomeadamente recolha de informação sobre as condições de alojamento, zona de proveniência, possíveis viagens efetuadas até zonas endémicas e acerca da perceção do dono do animal em relação às alterações apresentada pelo mesmo (75,95). É importante averiguar se foram detetados alguns sinais clínicos característicos, nomeadamente perda de condição corporal, alterações cutâneas, polidipsia-poliúria e epistaxis [93].

Um exame físico adequado e exaustivo é importante no sentido de garantir a máxima recolha de informação e averiguar alterações clinicopatológicas frequentes, especialmente lesões cutâneas e linfadenomegália. Não obstante, poderão existir sinais clínicos que ocorrem com menor frequência nos pacientes de LCan e que podem desviar o médico veterinário clínico do diagnóstico correto [95]. Outras alterações podem não ser perceptíveis na realização do exame físico e apenas são detetadas por exames imagiológicos, como o exemplo da hepatoesplenomegalia [93].

Especial atenção deve ser tida em relação aos diagnósticos diferenciais, no sentido da apropriada exclusão de outras afeções que mimetizam as manifestações clínicas da LCan, como por exemplo algumas doenças linfoproliferativas que também resultam em linfadenomegalia e outras doenças responsáveis por epistaxe como erliquiose neoplasias nasais e aspergilose. Algumas doenças infecciosas, nomeadamente de transmissão vetorial, coexistem frequentemente com a LCan, sobretudo a babesiose e a erliquiose, e até mesmo a hepatozoonose e a anaplasmose [75]. Algumas destas também apresentam também manifestações compatíveis com LCan, tornando-se importante o diagnóstico diferencial [42].

Posteriormente à obtenção dos dados do exame físico é necessário a recolha de dados laboratoriais básicos, nomeadamente a recolha de dados bioquímicos, análise de hemograma, análise de urina e análise do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas, com o intuito de perceber as manifestações multissistémicas da LCan [7].

Por vezes, as alterações destes parâmetros são a única indicação de doença em animais aparentemente saudáveis. As alterações dos dados laboratoriais básicos mais frequentemente encontradas são anemia normocrómica, normocítica e não regenerativa, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, rácio albuminas/globulinas reduzido e proteinúria glomerular [95].

Na análise dos parâmetros bioquímicos é importante o controlo da azotemia, pois avalia o grau de depuração renal dos compostos azotados. Neste sentido é indicado a avaliação dos parâmetros bioquímicos dos valores de creatinina (CRE), ureia (BUN) e fósforo circulantes [95].

A análise de urina é também imprescindível para a monitorização da função renal e para determinar o grau de proteinúria e o rácio urinário proteína/creatinina, bem como para determinar a densidade específica urinária, que se encontra geralmente diminuída [95]. A proteinúria persistente geralmente traduz-se por um rácio proteína/creatinina urinária igual ou superior a 0,5 e deve-se a dano glomerular (10,83). O controlo da azotemia, função renal e presença de proteinúria manifesta-se de extrema importância na determinação da terapia adequada bem como no estabelecimento do prognóstico do animal [95].

É também importante o controlo do nível das enzimas hepáticas, nomeadamente da ALT, AST, ácidos biliares séricos pós-prandiais e bilirrubina total. É frequente nos animais com manifestações de LCan um aumento moderado da concentração sérica das enzimas hepáticas [95].

A generalidade dos animais que desenvolvem LCan apresenta um perfil bioquímico clássico onde se evidencia hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, traduzindo-se num rácio albuminas/globulinas reduzido [10]. A hiperglobulinemia é devida à gamopatia policlonal β e γ e por vezes também de α -2 e β -globulinas. Neste sentido, recomenda-se a elaboração de um perfil eletroforético das proteínas do sangue para rastrear quais as imunoglobulinas se encontram em maior concentração [6]. A hipoalbuminemia surge principalmente por nefropatia com perda de proteína, doença hepática, inflamação crónica intestinal e malnutrição (6,96).

Outras alterações dos parâmetros bioquímicos são também por vezes evidenciadas como hipercolesteronemia e aumento dos triglicerídeos, aumento da creatinina quinase e lactatodesidrogenase quando ocorre miosite, hiper- ou hipocalemia e aumento das proteínas da fase aguda como as proteínas C reativa, amiloide A e haptoglobina [95].

A alteração hematológica mais frequente é a evidenciação de uma anemia não regenerativa normocítica e normocrômica, embora outras menos frequentes estejam também associadas como leucocitose ou ligeira leucopenia, neutrofilia ou neutropenia, eosinofilia ou eosinopenia, linfocitose ou linfopenia, monocitose ou monofilia e trombocitopenia. São também evidenciadas alterações nos perfis de coagulação e hiperviscosidade do soro (83,95).

Contudo, é estimado que o diagnóstico baseado apenas nos dados do exame físico, análise das alterações clinicopatológicas e dos dados dos métodos laboratoriais tem uma eficácia de deteção das infeções por *L. infantum* inferior a 50%, tornando necessário a execução de testes específicos de diagnóstico para estabelecer o diagnóstico definitivo [97].

6.2 Métodos específicos

Estes métodos envolvem a análise parasitológica por observação do agente parasita, por exame citológico ou histológico/imunohistoquímico, ou os exames serológico ou molecular.

6.2.1 Diagnóstico parasitológico

6.2.1.1 Avaliação citológica

É um recurso muito útil no diagnóstico de *Leishmania*, pois permite ao clínico a observação microscópica direta do parasita, garantindo uma especificidade ótima do teste com o mínimo de custos e material necessário para a sua realização. No entanto, a sensibilidade do teste depende do nível técnico do executante, qualidade de preparação da amostra, tempo despendido na análise da mesma e carga parasitária na amostra extraída. É consensual na comunidade científica que este teste apresenta sensibilidade reduzida na deteção de *Leishmania* em animais subcl clinicamente infetados [95].

A avaliação citológica deve ser realizada através do recurso a uma agulha fina (citologia aspirativa por agulha fina, CAAF) e aspirando o conteúdo de tecidos com lesões suspeitas, como dermatites nodulares, papulares ou ulcerativas, medula óssea, linfonodos,

sangue periférico e fluídos biológicos de locais afetados, como líquido articular em casos de artrite ou poliartrite, ou líquido cefalorraquidiano quando estão presentes sinais neurológicos [93].

Para garantir uma maior sensibilidade do teste, recomenda-se a análise citológica complementar de medula óssea e linfonodo, com sensibilidades descritas ente os 60-75% para o primeiro e 30-50% para o segundo tecido. Contudo, nos animais que apresentam LCan clínica a sensibilidade pode aumentar para 88,2% para o primeiro tecido e entre 83,8% e 92,6 % para o segundo tecido [98]. Este fato explica-se devido à maior carga parasitária existente nos animais com LCan clínica. A sensibilidade da análise citológica aumenta quando ambos os tecidos são analisados e quando se examinam mais campos microscópicos (71-91%) [99]. É aconselhada a punção de qualquer linfonodo que se encontre hipertrofiado em todos os animais suspeitos de padecerem de LCan (18,95). Os locais descritos para recolha de amostras de medula óssea são as uniões costocondrais e o esterno, mas só deve ser efetuado quando não se encontram formas amastigotas na análise citológica do linfonodo poplíteo e da pele lesionada (75,95).

Após recolha das amostras estas devem ser coradas com Giemsa e visualizadas microscopicamente a uma ampliação de 1000x. As formas amastigotas encontram-se principalmente no interior de macrófagos infetados, mas também se podem encontrar extracelularmente [100].

6.2.1.2 Avaliação histológica

A análise histológica é também utilizada para definir o diagnóstico de LCan, ao analisar amostras de órgãos afetados, coradas através de hematoxilina-eosina [18]. Por vezes, é possível a visualização direta do parasita; no entanto, neste exame pode ser difícil, sendo muito mais visíveis as alterações microscópicas provocadas pela ação do parasita [95]. A LCan deve ser suspeitada em tecidos que demonstrem uma inflamação granulomatosa, piogranulomatosa ou linfoplasmocitária. O mesmo sucede quando se evidencia hiperplasia reativa numa amostra de gânglio linfático [83].

Apresenta algumas desvantagens em relação à citologia, pois pode apenas detetar alterações microscópicas altamente sugestivas de leishmaniose, contudo não confirma definitivamente o diagnóstico sem a visualização direta da forma amastigota. Outras desvantagens são o custo do meio de diagnóstico, o elevado tempo de execução, relativa baixa especificidade e o fato de ser um método relativamente invasivo [95].

Na prática clínica é usual a análise histopatológica de biópsias cutâneas de zonas lesionadas, suspeitas de serem causadas pela infeção por *L. infantum*, mas mais com o intuito de descartar outras afeções do que para confirmar definitivamente o diagnóstico de LCan [95]. Está descrito que para uma melhor eficácia do teste o melhor local para recolha de amostra é o linfonodo poplíteo (43,9% em animais subcl clinicamente infetados) [18].

Para aumentar a sensibilidade do teste é aconselhado o exame histopatológico com recurso à IHQ, sendo útil especialmente nos animais com baixa carga parasitária. [101] A IHQ pode ser conduzida através da utilização da imunoperoxidase e imunofluorescência direta [18]. Contudo, a IHQ sofre de algumas limitações, pois poderão existir reações cruzadas. Com apresentação de um resultado negativo neste exame é aconselhado o diagnóstico com recurso às técnicas de deteção molecular [93].

6.2.1.3 Cultura do parasita

É um método extremamente específico, pois permite o seu desenvolvimento até às formas promastigotas, o estado flagelado exclusivo ao género *Leishmania*, mas carece de utilização clínica devido ao elevado tempo de incubação, superior a 30 dias e por apenas ser possível a sua realização em laboratórios especializados [100].

6.2.2 Xenodiagnóstico

É um exame que permite que um animal suspeito de infeção por *L. infantum*, após sedação e colocação em jaula, seja fonte de alimentação sanguíneo de flebótomos, com origem em colónias controladas laboratorialmente. Os insetos são posteriormente recolhidos e é efetuada a pesquisa de formas promastigotas no seu intestino [100]. Este meio de diagnóstico é raramente utilizado na prática clínica principalmente por apenas poder ser executado em laboratórios especializados [18].

6.2.3 Análise serológica

O diagnóstico com recurso aos métodos serológicos é amplamente utilizado, pois permite detetar IgG específicas para *Leishmania* no soro de um animal suspeito, com recurso a várias técnicas principalmente a IFI, ELISA e testes rápidos comerciais (imunomigração ou imunocromatografia) (83,100). Outros testes como a imunodeteção (WB, “western blot) de Western blotting, apesar de apresentarem maior sensibilidade,

não são utilizadas na prática clínica comum, principalmente devido à necessidade da sua realização em laboratórios especializados (75,93).

A análise serológica é o meio de abordagem diagnóstica mais utilizado, pois detecta e quantifica as imunoglobulinas circulantes (IgG principalmente), que tendem a apresentar-se em grande concentração nos animais afetados, em virtude da excessiva resposta imunitária humoral desenvolvida pelos mesmos [95]. Não obstante, a generalidade dos animais doentes (88-100%) consegue ser detetada através deste método, mas apenas 30-66% dos cães subcl clinicamente infetados se encontram seropositivos, devido ao baixo nível de anticorpos existentes nestes animais (101,102).

O período de seroconversão (desde o momento da infeção) pode ser longo e variar entre 1 e 22 meses, sendo que em média dura 5 meses [93]. Um exame serológico que detete altos níveis de anticorpos num animal suspeito de LCan confirma o diagnóstico (83,100).

6.2.4 Imunofluorescência indireta (IFI)

Um dos métodos serológicos preferencialmente utilizados na prática clínica é a IFI, tendo sido classificado como o método “gold standard” (padrão-ouro) no diagnóstico da LCan. É amplamente utilizado na realização de estudos epidemiológicos e tanto no diagnóstico de infeção como no seguimento da terapêutica instituída. Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, este teste é descrito como o teste serológico de referência para o diagnóstico de leishmaniose pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE)[93]. Segundo Rosypal et al. [103], nas titulações de 1/50 e 1/100 este método apresenta uma sensibilidade de 92 e 89% respetivamente. Contudo está descrito que a sensibilidade do IFI varia de 26% a 100% [18].

Este método baseia-se na preparação de diferentes titulações de soro do animal suspeito por ordem decrescente de concentração em diferentes lâminas. Essas lâminas estão revestidas por formas promastigotas de *Leishmania*, às quais se ligarão os anticorpos presentes num animal seropositivo. Posteriormente são adicionados anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína com especificidade para os anticorpos anti-*Leishmania* do animal suspeito [93]. As amostras são depois avaliadas microscopicamente e as que demonstrarem uma fluorescência verde e homogênea das formas promastigotas são classificadas como positivas; e as que demonstrarem uma cor vermelha fosca são negativas [18]. É também determinado em que titulação ocorre a

ligação anticorpo-anticorpo, prevendo-se a concentração de imunoglobulinas específicas contra *Leishmania* circulantes no animal suspeito [93].

Desta forma, a IFI é um meio de diagnóstico muito útil na detecção de animais com infecção subclínica, que geralmente apresentam baixos títulos de anticorpos e baixa carga parasitária, a par da detecção dos animais com manifestações da doença e alta carga parasitária, que geralmente apresentam altos níveis de anticorpos [100].

Não obstante este teste de diagnóstico apresenta algumas desvantagens, nomeadamente a possibilidade de ocorrência de reações serológicas cruzadas em locais onde *Leishmania* e *Trypanossoma cruzi* são simpátricos, como também pode apresentar subjetividade dos resultados do teste pois a avaliação da intensidade de fluorescência pode não ser consensual [100].

6.2.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

ELISA é um método muito útil para análise laboratorial, capaz da análise de um elevado número de amostras num curto período de tempo, de forma simples e capaz de detetar vários antigénios desde todo o citoplasma, antigénios purificados, péptidos sintéticos e proteínas recombinantes [18]. É um teste avaliado como tendo elevada sensibilidade, que aumenta quando são usados mais do que um antigénio em simultâneo [100]. Um estudo demonstrou uma sensibilidade de 100% em animais afetados e de 94,1% em animais infetados mas aparentemente saudáveis [104].

Numa amostra de um animal seropositivo, desenvolve-se uma reação colorimétrica que pode ser quantificada por espectrofotometria laboratorialmente, contrariamente à avaliação subjetiva da emissão de fluorescência no IFI [93]. Existem alguns testes ELISA disponíveis comercialmente [100].

6.2.6 Imunocromatografia

Estão disponíveis, principalmente para a prática clínica, vários testes rápidos de imunocromatografia ou imunomigração, diferindo entre eles pelos reagentes e antigénios utilizados. Apresentam sensibilidade inferior ao IFI e testes de ELISA, podendo a mesma variar entre os 30% e os 70% e são apelativos para a prática clínica pela fácil execução dos testes e capacidade de avaliar o resultado sem necessidade de recurso ao exame laboratorial [93].

É também um método que apresenta elevada especificidade o que lhe confere uma vantagem na capacidade de distinção entre infecção por *Leishmania* spp. e *T. cruzi* (83,100). A maior desvantagem destes testes reside no fato de que estes apenas atestam a presença de anticorpos específicos para *Leishmania* no soro do animal (qualitativos), e para confirmar o diagnóstico pode ser necessária a repetição do teste com métodos quantitativos (IFI ou ELISA) (93,95).

Em todos os animais que apresentem baixos níveis de anticorpos nos resultados dos exames serológicos e em que se mantenha a suspeita de LCan, deve-se recorrer a outras técnicas com mais sensibilidade, como PCR [83].

6.2.7 Métodos de pesquisa molecular

Várias técnicas de pesquisa de molecular são utilizadas com frequência crescente no diagnóstico e identificação de *Leishmania* spp., nomeadamente as técnicas baseadas na PCR [100]. As mais utilizadas são a PCR convencional, “nested”-PCR e PCR em tempo real, e destas a última é a que apresenta maior sensibilidade [95].

Os métodos de pesquisa molecular melhoraram nos últimos anos a sensibilidade do diagnóstico parasitológico da LCan [83]. A capacidade diagnóstica destes métodos de amplificação genómica mostrou-se mais elevada em comparação com os métodos serológicos, análise microscópica e cultura, especialmente em amostras com baixa carga parasitária [105]. Os métodos baseados na PCR são úteis para o diagnóstico de LCan em animais com resultados duvidosos nos testes serológicos e em locais onde existem reações serológicas com tripanossomas [101].

Estas técnicas permitem a amplificação de sequências genómicas específicas de *Leishmania* e demonstram elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico da LCan, que pode ser potenciada quando as sequências genómicas selecionadas fazem parte do ADN do cinetoplasto (kDNA) (83,93). Contudo, alguns fatores podem contribuir para a existência de resultados falsos negativos. A eficácia da técnica de PCR vai depender de vários fatores nomeadamente dos “primers” (iniciadores) utilizados, número de cópias de ADN existentes na amostra, método de extração, tipo de amostras biológicas analisadas e protocolo seguido [18].

Sob condições ótimas, estes métodos possibilitam a deteção de fragmentos de ADN parasitário em diversos tecidos (pele, linfonodos, medula óssea, baço e zaragatoas conjuntivais) e fluídos biológicos como no sangue, “buffy coat” (capa leucocitária) e

urina [95]. No entanto, a sensibilidade aumenta quando a amostra analisada apresenta elevada carga parasitária, nomeadamente em tecidos como medula óssea, linfonodos, baço e pele; mas quando os tecidos analisados são “buffy coat”, sangue periférico ou urina a sensibilidade dos testes é geralmente inferior (83,95).

A análise por PCR de medula óssea e linfonodos em conjunto demonstrou ser mais sensível do que a análise citológica e cultura dos mesmos tecidos. [83] Estudos evidenciaram sensibilidades de deteção por PCR de 99% em linfonodos, 94% em amostras sanguíneas e 95 % em amostras de tecido cutâneo de animais infetados e doentes [106].

Os métodos de análise por PCR não são apenas úteis no diagnóstico de infeção, como também são importantes para o controlo da parasitemia após instituição de terapêutica. Nesse sentido, o teste de PCR em tempo real tem vindo a substituir tanto a PCR convencional como a “nested”-PCR no diagnóstico e acompanhamento da terapêutica instituída [107]. Este é um método quantitativo que determina com grande fiabilidade o número de sequências de ADN de *Leishmania* existentes numa amostra inicial, contabilizadas através de sondas com emissão de fluorescência [18].

Estudos demonstraram que além da capacidade de quantificação da carga parasitária o teste de PCR em tempo real apresenta também sensibilidade consideravelmente superior em relação ao teste de PCR convencional, nomeadamente na análise de amostras de medula óssea e de sangue. O teste de PCR convencional apenas consegue apresentar resultados positivos nos animais com uma parasitemia estimada em 30 parasitas por mililitro de sangue, enquanto o teste de PCR em tempo real tem um limiar de deteção inferior a um parasita por mililitro de amostra [101].

Em conclusão, o diagnóstico da LCan pode ser efetuado com eficácia por análise citológica, serológica e métodos moleculares. A abordagem diagnóstica aconselhada (Figura 6) consiste primariamente na realização de exames serológicos quantitativos em todos os animais com manifestações compatíveis com LCan (dermatite exfoliativa e linfadenomegalia principalmente) e com alterações clinicopatológicas associadas a alterações hematológicas (anemia), alterações dos parâmetros bioquímicos (diminuição do rácio albuminas/globulinas) e análise de urina (proteinúria). Dependendo dos resultados, poderão depois ser aplicados métodos mais sensíveis.

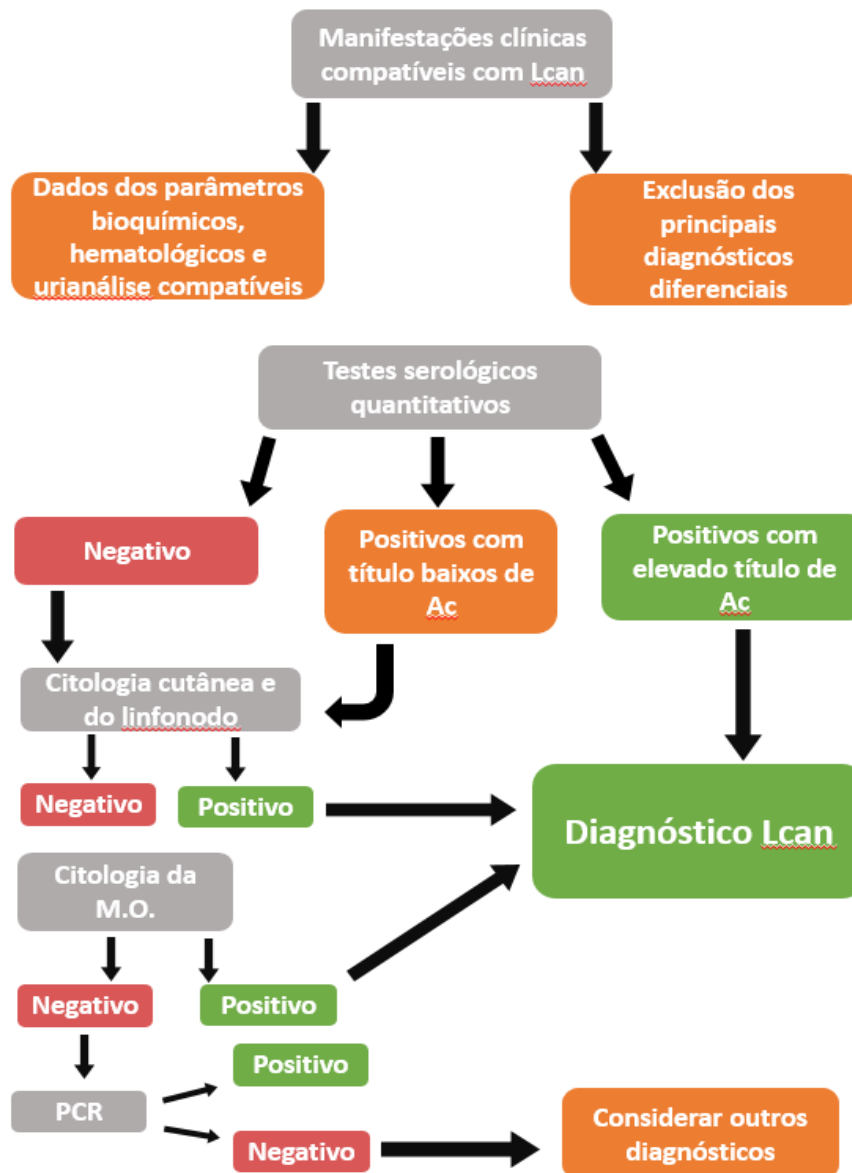


Figura 6: Esquematização de abordagem diagnóstica recomendada para LCan. Adaptado de [95]

7. Tratamento:

Apesar de vários avanços conseguidos principalmente na área do diagnóstico e controlo da LCan, a terapêutica desta patologia está longe de ser a ideal. A maioria dos fármacos utilizados apenas consegue atuar no controlo e remissão dos sinais clínicos, mas nenhum é garantidamente eficaz na cura parasitológica (95,101). As recorrências são frequentes e mesmo alguns cães tratados são capazes de transmitir o parasita aos vetores [101]. A maioria dos animais sujeitos a protocolos terapêuticos de ação curta sofre uma recaída ou recorrência num espaço temporal inferior a um ano após o término do tratamento [95].

Especialmente nos locais onde a doença é endêmica seria importante adquirir uma terapêutica eficaz no sentido da remissão dos sinais clínicos como também para a eliminação parasitária do hospedeiro afetado no sentido de diminuir a população de hospedeiros reservatórios de infecção para outros cães e para os humanos [108].

O tratamento da LCan continua a ser um desafio para os clínicos veterinários, no sentido de que esta doença apresenta uma patogenia complexa e uma ampla diversidade de alterações clinicopatológicas em diversos tecidos e órgãos [9]. Os objetivos principais a considerar no tratamento da LCan são o controle dos sinais clínicos e alterações clinicopatológicas associadas, estimular a imunidade celular protetora, diminuir a carga parasitária e consequente diminuição do risco de transmissão de *Leishmania* aos vetores flebotomíneos [95].

Vários fármacos estão descritos para a terapêutica da LCan, particularmente os antimoniais pentavalentes, alopurinol, miltefosina, anfotericina B e outros menos utilizados como aminosidina, marbofloxacin, cetoconazol, enrofloxacin, metronidazol e pentamidina [101]. Os únicos fármacos registados na União Europeia (UE) especificamente para o tratamento da LCan são o antimoniato de meglumina, a aminosidina e a miltefosina. Os mais utilizados são os antimoniais pentavalentes, nomeadamente o antimoniato de meglumina juntamente com a administração de alopurinol, sendo a combinação entre ambos classificada como a mais eficaz na terapêutica e constitui a primeira linha terapêutica no controlo da doença e da infecção [83].

7.1 Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes incluem o antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, e exibem uma função leishmanicida ao inibir seletivamente enzimas parasitárias necessárias para glicólise e oxidação dos ácidos gordos. O protocolo de administração mais utilizado consiste na administração de 75-100 mg/kg de peso corporal, uma vez por dia durante 3-4 semanas, preferencialmente através de via subcutânea (SC). Não obstante, outros protocolos estão descritos, como a administração de antimoniato de meglumina na dosagem de 40-75 mg/kg duas vezes por dia, durante 4-6 semanas. É aconselhada também a combinação com alopurinol em ambos os protocolos, no sentido de diminuir a percentagem de recaídas e recorrências (95,108). Foi sugerido que tem sido desenvolvida resistência ao antimoniato de meglumina por parte de

Leishmania, principalmente devido ao seu amplo uso bem como devido a subdosagens nos protocolos terapêuticos, tanto em seres humanos como em cães [109].

Administrações pela via intramuscular (IM) não são recomendadas devido a alguns efeitos secundários geralmente fibrose muscular e formação de abscessos. Os antimoniais pentavalentes apresentam alguns efeitos secundários, como nefrotoxicidade, anorexia, vômitos, diarreia e dor no local da injeção [95]. Neste sentido, é importante a avaliação e monitorização da função renal antes de instituir os antimoniais pentavalentes como terapêutica, para avaliar o risco de toxicidade renal deste fármaco.

7.2 Alopurinol

O alopurinol é um fármaco análogo das purinas, com efeito leishmanioestático utilizado no tratamento da LCan, isolado ou em combinação com fármacos, nomeadamente com os antimoniais pentavalentes (95,110). Desenvolve o seu efeito leishmanioestático através da formação de 4-aminopirrazolopirimidina trifosfato, um análogo tóxico do ATP, que após sua incorporação no ARN parasitário inibe a síntese proteica parasitária [109]. Tem poucos efeitos secundários associados, mas é aconselhada a monitorização da função renal e hepática antes da instituição da terapia. Por vezes ocorre a formação de urólitos de xantina devido à administração prolongada de alopurinol, principalmente nos cães com doença hepática [108]. O protocolo de administração de alopurinol recomendado é a administração de 10-15 mg/kg PO, duas vezes por dia durante um período mínimo de 6-12 meses [95].

A combinação do alopurinol com os antimoniais pentavalentes tem sido amplamente utilizada, e vários estudos comprovam um sinergismo de ambos os fármacos na remissão dos sinais clínicos. Esta combinação permite diminuir a duração do tratamento com antimoniato de meglumina, tornando a terapia mais bem tolerada e menos dispendiosa. A administração prolongada de alopurinol permite também diminuir a percentagem de recorrências [108]. Estudos demonstraram que a administração periódica de alopurinol mantém eficazmente o estado de remissão dos sinais clínicos em animais que foram tratados com sucesso [111].

Uma alternativa a este protocolo terapêutico passa pela combinação do alopurinol com outro fármaco leishmanicida, a miltefosina. O alopurinol também pode ser utilizado como agente isolado no protocolo terapêutico em países onde os antimoniais pentavalentes e a miltefosina não se encontrem disponíveis no mercado, como também no tratamento

dos animais com insuficiência renal, devido à inexistência de efeitos nefrotóxicos deste fármaco e de possibilitar uma redução nas lesões renais e subsequente proteinúria [95].

7.3 Miltefosina

A miltefosina é um fosfolípido desenvolvido primariamente como fármaco anti-neoplásico, que demonstrou ter capacidade de eliminar o parasita tanto *in vitro* como *in vivo* [95]. Desenvolve a sua ação farmacológica ao perturbar as vias de sinalização intracelular e da síntese da parede celular, induzindo apoptose e morte celular do parasita [109]. A miltefosina apresenta também outros efeitos benéficos no combate à infecção, nomeadamente através do estímulo dos linfócitos T e da atividade macrofágica por aumento da produção de oxigénio e azoto reativo necessários à eliminação parasitária [95].

O seu uso como agente isolado reduz significativamente a carga parasitária, contudo não garante cura parasitológica. Estudos demonstraram um aumento da carga parasitária 6 meses após o término da terapêutica. Neste sentido, é aconselhável a combinação deste fármaco com o alopurinol (mínimo 6-12 meses, no sentido de diminuir a taxa de recorrências. Tem poucos efeitos secundários associados e, quando presentes, estão praticamente restritos à possível existência de vômitos em cerca de 11 a 23% dos animais tratados. É aconselhada a sua administração especialmente nos pacientes com dano renal, devido à baixa nefrotoxicidade deste fármaco [95].

A miltefosina tem a especificidade de poder ser administrada *per os* (PO), o que pode ser apelativo, em virtude da facilidade de execução do tratamento, tanto para os donos como para o próprio animal. Este fármaco representa também uma boa alternativa aos protocolos mais utilizados, no sentido de que alguns estudos comprovam eficácia semelhante na diminuição da carga parasitária, como também a utilização de diferentes protocolos terapêuticos é aconselhada no sentido de diminuir a seleção de organismos resistentes aos fármacos utilizados no tratamento da LCan [109].

O protocolo terapêutico mais utilizado englobando a utilização de miltefosina consiste na administração sob a dosagem de 2 mg/kg PO, uma vez por dia durante 4 semanas, simultaneamente com a administração de alopurinol na dosagem de 10-15 mg/kg PO, duas vezes por dia num período mínimo de 6-12 meses [95].

7.4 Anfotericina B

A anfotericina B é um agente farmacológico extraído de uma bactéria actinomiceta, nomeadamente *Streptomyces nodosus*. É utilizado principalmente devido à sua ação antifúngica, no entanto este agente farmacológico demonstrou ter propriedades que permitem o combate a alguns protozoários, nomeadamente dos géneros *Leishmania* e *Naegleria* [108]. Em muitos países onde a LCan é endémica, tem-se revelado a existência de resistência aos antimoniais pentavalentes por parte de *Leishmania* spp., tanto na Lcan como na LV humana. Na área da medicina humana este fármaco tem-se afirmado como opção de primeira linha no combate à LV humana, principalmente nos pacientes com coinfeção com VIH [112].

A anfotericina B exerce o seu efeito farmacológico através da ligação exercida por esta molécula ao ergosterol parasitário, resultando em alterações da permeabilidade da parede celular parasitária, que se traduz no aumento do fluxo de potássio intracelular e respetiva morte do parasita. A anfotericina B liga-se às moléculas esteroides, podendo também ligar-se ao colesterol existente nas membranas celulares dos mamíferos, sendo essa ligação responsável pela elevada nefrotoxicidade associada a este fármaco. As lesões renais são devidas a vasoconstrição e por ação direta nas células epiteliais renais. Contudo esta nefrotoxicidade tem vindo a ser diminuída devido às novas formulações, especialmente a associação lipídica [108]. Outros efeitos adversos como pirexia, vômitos e anorexia, podem também ser observados [9].

Este fármaco pode apresentar algumas formulações distintas, nomeadamente pode existir na sua forma livre e extremamente nefrotóxica, e numa formulação mais recente, associado a lípidos, nomeadamente a forma de anfotericina B desoxicolato. Esta formulação apresenta um menor grau de toxicidade renal. Alguns estudos demonstram maior eficácia deste fármaco no combate à LCan em relação aos antimoniais pentavalentes tanto em cães como em humanos (108,113). Contudo, devido à sua utilização em medicina humana, o seu uso no combate à LCan é desaconselhado pela OIE, no sentido de prevenir o aparecimento de estirpes de *Leishmania* resistentes [9]. O protocolo terapêutico da sua utilização no combate a LCan consiste na administração de 0,5 mg/kg de anfotericina B desoxicolato, IV, duas a três vezes por semana [108].

7.5 Aminosidina

Aminosidina, ou paramomicina, é um antibiótico incluído na classe dos aminoglicosídeos que também tem propriedades na luta contra protozoários. Desenvolve a sua ação leishmanicida essencialmente por impedir a união das subunidades ribossomais e consecutiva quebra na tradução proteica [9]. Apresenta boa eficácia na melhoria e remissão dos sinais clínicos, contudo é possível a existência de efeitos adversos graves dose-dependentes, nomeadamente efeitos tóxicos no rim e no sistema vestibular (9,95).

O protocolo terapêutico englobando a utilização de aminosidina, mais utilizado consiste na administração da mesma na dose de 5 mg/kg por via SC, uma vez por dia durante 3 semanas, juntamente com a administração de 60 mg/kg de antimoniato de meglumina administrado IM, duas vezes por dia durante 4 semanas [9]. Não obstante estão também descritos protocolos terapêuticos utilizando a aminosidina como agente farmacológico isolado, nomeadamente a administração uma vez por dia de 15 mg/kg de aminosidina SC durante 21 dias consecutivos [114].

7.6 Marbofloxacin

A marbofloxacin é um antibiótico pertencente à classe das fluoroquinolonas, que também apresenta propriedades leishmanicidas principalmente por estimular a atividade macrofágica através do incremento de FNT- α e da estimulação das vias que conduzem à formação de óxido nítrico [95]. Alguns estudos demonstraram uma eficácia de cerca de 69%, quando utilizada na dosagem de 2 mg/kg PO, uma vez por dia durante 28 dias, todavia foi evidenciada uma alta percentagem de recorrências (53% dos animais intervencionados), em média 5,5 meses após término do tratamento. Não obstante, desconhece-se se a incorporação da administração prolongada de alopurinol neste protocolo terapêutico teria sido benéfica no sentido da diminuição das recorrências [95].

7.7 Metronidazol + espiramicina

Especialmente devido às propriedades leishmanicidas evidenciadas pelo metronidazol *in vitro*, alguns investigadores realizaram um protocolo terapêutico experimental englobando a associação metronidazol (25 mg/kg PO, SID) com espiramicina (150000 U/kg PO, SID). Foi comparado com um grupo controlo tratado

segundo um protocolo com a associação de antimoniais pentavalentes e alopurinol, e os resultados em termos de eficácia em ambos os grupos foram semelhantes [9].

7.8 Imunoestimulantes (domperidona)

A domperidona é um fármaco antiemético e procinético que atua como antagonista competitivo dos recetores dopaminérgicos D2, e apresenta também a capacidade de estimular a produção de serotonina. O aumento de serotonina influi por sua vez num aumento reversível dos níveis séricos de prolactina (PRL) (95,115). A PRL é uma hormona neuroendócrina produzida na hipófise que revelou também ter também um papel imunoestimulador, atuando como uma citocina pró-inflamatória derivada dos linfócitos [116]. Foi descrito pela primeira vez num estudo realizado em hamsters um papel imunomodulatório importante no combate à LCan por parte da prolactina [117].

Altas concentrações séricas de PRL demonstraram ter como consequência um aumento na população linfocitária CD4⁺ Th1 e um subsequente aumento das citocinas IL2, IL12, FNT α e IFN- γ e diminuição da população linfocitária CD4⁺ Th2 e subsequente diminuição de TNF- β . O aumento da população linfocitária Th1 e respetivas citocinas inflamatórias, como já referido, conduz à ativação macrofágica e recrutamento de células NK, auxiliando assim à destruição dos parasitas [116]. O uso de domperidona mostrou também ser eficaz no controlo e redução dos sinais clínicos, bem como também no decréscimo dos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* [115]. Num estudo realizado por Gómez-Ochoa et al, a administração de 1 mg/kg PO BID de domperidona resultou num decréscimo dos títulos de anticorpos em 74% dos animais subcl clinicamente infetados ou com manifestações ligeiras de LCan. Cerca de 40% deste grupo de animais apresentaram mesmo resultados negativos nos testes serológicos. Nos animais que apresentavam doença avançada e manifestações graves de LCan observou-se uma estabilização dos títulos de anticorpos em 57% destes animais, enquanto 36% dos mesmos apresentaram mesmo uma diminuição do título de anticorpos específicos [116].

A domperidona encontra-se disponível comercialmente sob indicação de seu uso tanto na terapêutica como na prevenção, através da administração de 0,5 mg/kg PO, duas vezes por dia durante 4 meses [95].

Antes da instituição da terapêutica é necessário uma avaliação clínica do estado do animal e da gravidade da doença e definir o estadiamento clínico de infeção. Foi proposto pela associação LeishVet um protocolo de estadiamento clínico dos animais com LCan e respetiva terapêutica aconselhada para cada estágio. Os sistemas de

classificação clínica têm como objetivo agrupar os animais de acordo com a gravidade do quadro clínico e também com vista à definição da terapêutica mais adequada a cada paciente e ao estabelecimento do prognóstico para cada estágio clínico[118]. Neste protocolo os animais são agrupados em quatro estádios clínicos diferentes baseados nos sinais clínicos e resultados dos exames laboratoriais e serológicos [95].

Os animais no estágio I manifestam a forma mais ligeira da doença, podendo apresentar como manifestações clínicas desde linfadenomegalia a dermatite papular, porém sem relevantes alterações hematológicas ou dos exames laboratoriais. Exibem também desde resultados negativos a um baixo título de anticorpos nos testes serológicos e não manifestam restrição no tipo de terapêutica a instituir. A generalidade dos animais incluídos neste estágio clínico apresenta bom prognóstico [7].

No estágio II incluem-se os animais que apresentam doença moderada, manifestando em conjunto com as manifestações descritas no estágio I lesões cutâneas simétricas ou difusas como dermatite exfoliativa, onicogribose, lesões ulceradas, anorexia, perda de peso, febre e epistaxis. Podem apresentar algumas alterações hematológicas como uma moderada anemia não regenerativa, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. Alguns animais podem apresentar os parâmetros de avaliação da função renal dentro dos valores normais, enquanto outros animais podem evidenciar proteinúria encontrando-se o rácio proteína/creatinina urinária (UPC) entre 0,5 e 1. Neste estágio II deve-se instituir como terapêutica a combinação de alopurinol com antimoniato de meglumina ou com miltefosina, mediante os danos renais existentes e respetiva função do órgão. O prognóstico varia desde bom a reservado [7].

O estágio III caracteriza-se pela presença dos sinais clínicos anteriormente descritos com a adição de sinais de doença severa ou grave nomeadamente as lesões características da deposição dos imunocomplexos circulantes como vasculites, artrites, uveítes e glomerulonefrites. As alterações hematológicas e bioquímicas são semelhantes às dos animais do estágio II, com a exceção do aumento da severidade dos danos renais e respetiva diminuição do órgão referido. Geralmente encontra-se insuficiência renal crónica (IRC) no estágio III, e os valores séricos de creatinina situam-se entre 1,4 e 2 mg/dl. A terapêutica aconselhada neste estágio clínico é a mesma descrita para o estágio II, mas deve-se seguir as orientações do programa IRIS no controlo das lesões renais [7].

No último estágio clínico, estágio IV, incluem-se os animais com doença muito severa manifestando as alterações anteriormente descritas com a adição de sinais de tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótica e doença renal em estágio terminal

(estádios III e IV - IRIS). Os valores de creatinina encontram-se entre 2 e 5 mg/dl no estágio III (IRIS), sendo superiores a 5 mg/dl no estágio IV (IRIS). Principalmente no estágio IV surge também proteinúria marcada (UPC > 5) [7].

7.9 Monitorização do tratamento

Vários protocolos terapêuticos descritos recomendam a monitorização e controlo de vários parâmetros clinicopatológicos durante e depois da instituição do tratamento. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos a controlar no decurso da instituição da terapêutica dependem das alterações clinicopatológicas de cada paciente. Em geral é recomendada a avaliação de exames hematológicos completos, painel bioquímico geral, análise d urina com rácio proteína/creatinina, e um perfil eletroforético das proteínas séricas/plasmáticas [95].

A frequência da monitorização varia consoante o animal, mas em geral cada paciente deve ser monitorizado no fim do primeiro mês de tratamento, cada 3-4 meses até completa remissão dos sinais clínicos, e depois uma ou duas vezes por ano. A medição dos títulos de anticorpos antes dos 6 meses após início do tratamento não é útil para a monitorização do mesmo; contudo, após esse período estes devem ser controlados a cada 6-12 meses. Um aumento superior a duas diluições consecutivas no teste de IFI sugere que tenha ocorrido recaída [116]. Contudo, alguns animais, apesar da melhoria dos sinais clínicos, não apresentam diminuição dos títulos de anticorpos desde 6 meses até um ano após o início do tratamento [83]. Os testes de pesquisa molecular, nomeadamente PCR em tempo real, são também bastante úteis na monitorização da terapêutica instituída, no sentido que determinam a carga parasitária existente na amostra analisada. Um decréscimo na carga parasitária significa o sucesso da terapêutica utilizada, enquanto um aumento da mesma significa uma recaída [95].

8. Prognóstico

O estabelecimento do prognóstico para os animais com LCan é difícil, existindo pouca informação e consenso sobre o mesmo. Como já referido, esta doença apresenta um vasto conjunto de alterações clinicopatológicas que variam individualmente, que influem diretamente no protocolo terapêutico e no prognóstico a estabelecer [83]. Contudo, em geral o prognóstico vai depender da presença de IRC e da severidade da

mesma, bem como da utilização adequada dos protocolos terapêuticos e monitorização da mesma, aconselhados na comunidade científica [95].

A instituição da terapia recomendada, nomeadamente os protocolos terapêuticos englobando a utilização da combinação dos antimoniais pentavalentes com o alopurinol, ou miltefosina com alopurinol, bem como uma monitorização terapêutica adequada revela-se de extrema importância no sentido de garantir o estado de remissão dos sinais clínicos e garantir a melhor qualidade de vida pelo maior período de tempo. Neste sentido, Torres et al evidenciaram que em 23 animais monitorizados até períodos superiores a 9 anos, apenas três evidenciaram recorrências [119]. Estudos demonstraram uma sobrevivência média de 4,7 anos dos animais sujeitos a tratamento, mas a sobrevivência revelou-se inferior nos animais que apresentavam hipoalbuminemia, proteinúria e azotemia de origem renal[95]. Outras publicações também revelaram que mais de 75% dos animais estudados, que não apresentaram sinais clínicos associados a disfunção renal, viveram por mais de 4 anos após instituição dos protocolos terapêuticos aconselhados [120].

9. Prevenção e controlo

Em sentido lato, o termo prevenção inclui a aplicação de medidas destinadas a evitar casos de infeção por um agente patogénico ou as consequências patológicas dos mesmos [9]. Um dos objetivos principais na profilaxia e controlo da leishmaniose incide na prevenção da picada dos vetores flebotómicos, diminuindo assim o risco de estabelecimento de infeção nos hospedeiros suscetíveis, nomeadamente o homem e o cão. (100,101). Outras medidas são também importantes na redução da população vetora, nomeadamente a utilização de inseticidas nas casas e abrigos dos animais, redes mosquiteiras impregnadas com inseticidas, aplicação dérmica de repelentes nos humanos e aplicação tópica de inseticidas nos cães [9]. Um estudo realizado no Irão comprovou que a utilização de coleiras impregnadas com inseticidas (deltametrina) diminuiu a seroconversão em cães e crianças numa zona endémica, atestando a importância destas medidas preventivas numa população canina [121].

A prevenção da picada do vetor artrópode na população canina pode ser alcançada seguindo um conjunto de diversas medidas, tais como: manter o animal dentro de casa nos períodos de maior atividade do vetor, nomeadamente desde o anoitecer até ao amanhecer; a alteração do micro-habitat do vetor tornando-o inóspito para o seu

desenvolvimento, particularmente os locais limítrofes das habitações e abrigos dos animais; a aplicação ambiental de inseticidas, especialmente nas casas e abrigos dos animais; e a aplicação tópica de inseticidas com atividade comprovada contra as espécies flebotomínicas que se alimentam nos canídeos [83].

Diversos compostos químicos demonstraram eficácia na prevenção da picada do flebótomo, estando disponíveis comercialmente várias formulações e diversas apresentações de inseticidas e repelentes de uso tópico para cães. Os piretróides sintéticos, nomeadamente a deltametrina e a permetrina, são atualmente os inseticidas mais utilizados, especialmente devido à baixa toxicidade na população canina e à sua eficácia farmacológica. Estão disponíveis comercialmente várias formulações e diversas modalidades de aplicação, nomeadamente coleiras impregnadas com deltametrina e soluções de administração tópica como soluções para pulverização (“sprays”) e soluções para unção puntiforme (“spot-ons”) [9].

As coleiras impregnadas com deltametrina libertam lentamente a substância ativa que é absorvida e difundida pela pele do animal, conferindo-lhe proteção em todo o corpo num período aproximado de 5-6 meses [122]. No entanto, apenas é garantida proteção contra as picadas de flebótomos uma semana após sua aplicação [100]. Sob condições laboratoriais constatou-se que o efeito repelente desta formulação protegeu 94% dos animais das picadas dos flebótomos até 34 semanas após a sua aplicação [44]. Nas zonas onde a leishmaniose é endémica aconselha-se a aplicação das coleiras no início do período sazonal de maior atividade dos vetores. Aos animais que vivem em territórios onde não existem casos de infeção por LCan devem ser aplicados das coleiras repelentes 1-2 semanas antes de uma viagem a um território onde esta é endémica, no sentido de garantir tempo suficiente para que a deltametrina seja difundida [122]. Foi recentemente introduzida no mercado uma coleira com ação comprovada para prevenir a infeção por *L. infantum*, contendo a sua formulação 10% de imidaclopride associado a 4,5% de flumetrina. Um estudo realizado numa zona onde a LCan é altamente endémica comprovou eficácia deste método de proteção de 93,4% contra a infeção [123].

As formulações para pulverização e os “spot-ons” demonstraram também eficácia na prevenção da picada do flebótomo, mas por tempo inferior à proteção garantida pela aplicação das coleiras repelentes [101]. Existem várias formulações associando piretróides com outros compostos, nomeadamente imidaclopride. Os “spot-ons” garantem proteção desde 24-48 horas após a sua aplicação até 21 dias depois [100]. Estão disponíveis comercialmente algumas “spot-ons” com atividade protetora comprovada,

nomeadamente soluções contendo permetrina a 65% e soluções combinando imidaclopride a 10% com permetrina a 50% [9]. Para esta última associação foi registada uma ação repelente com eficácia superior a 90% durante 3 semanas, e com efeito inseticida de cerca de 50% [124]. Foi também comprovada uma proteção mais eficaz quando a mesma associação foi administrada duas vezes por mês relativamente à administração mensal [125]. A utilização de “spot-ons” com a formulação de permetrina a 65% revelou também eficácia adequada como repelente durante 3 semanas, enquanto a atividade inseticida apenas é evidenciada até 2 semanas após aplicação. Não obstante, na prevenção de LCan o efeito repelente manifesta maior importância e neste sentido este método revela-se importante no controlo da doença [126].

Relativamente aos repelentes e inseticidas de aplicação por “spray” (pulverização), a atividade inseticida é imediata. Uma formulação associando permetrina e piriproxifeno garante proteção de 87-94% dos animais, por um período de 3-4 semanas [9].

Os proprietários dos animais devem ser corretamente aconselhados sobre o meio de proteção mais adequado, no sentido de garantir que estes são corretamente utilizados. Os métodos “spot on” e de aplicação por “spray” devem ser reaplicados frequentemente (2-3 semanas) no sentido de garantir proteção eficaz, enquanto as coleiras apenas necessitam ser trocadas duas vezes por ano no sentido de assegurar proteção contra a picada do flebótomo. Devem também ser informados acerca do período de início de atividade farmacológica dos diferentes métodos de proteção, nomeadamente nos animais que irão viajar desde territórios indenes para outros onde a LCan é endémica [100].

Estas medidas preventivas devem ser encorajadas por parte do médico veterinário junto dos proprietários dos animais saudáveis com ausência de infeção, como também dos proprietários de cães infetados e doentes e dos animais tratados, mesmo que em remissão dos sinais clínicos. Está provado que mesmo animais com baixa carga parasitária em circulação podem constituir uma fonte de infeção para os vetores flebotomíneos e consequente para outros animais e homem [95].

Além dos produtos repelentes e inseticidas de administração tópica, foi recentemente introduzido no mercado um método profilático consistindo na administração oral de domperidona, que como já referido apresenta competência no tratamento e prevenção da LCan [122]. Um estudo evidenciou que os cães apenas medicados profilaticamente com domperidona, com um regime de administração bidiário segundo a dosagem de 0,5 mg/kg durante 4 meses consecutivos, apresentaram um risco

de infecção ativa sete vezes inferior em relação aos animais aos quais não foi instituída qualquer terapia. Foi registada uma prevenção de 80% durante o primeiro ano de instituição da medicação profilática e de 77% 21 meses depois.

A vacinação constitui uma medida adicional para o controlo e prevenção da LCan no âmbito da medicina veterinária e da saúde pública. Diversos estudos foram realizados utilizando hamsters e murganhos como modelos experimentais, com o objetivo de definir as classes de imunogénios com melhores capacidades na indução de proteção imunitária. Destes destacam-se os parasitas mortos e intactos, frações celulares purificadas, componentes proteicos parasitários, proteínas recombinantes múltiplas de *Leishmania* ou do vetor flebotomíneo, ADN plasmídico e partículas virais contendo os fatores de virulência parasitários codificados. O principal propósito na obtenção de uma vacina eficaz é estimular uma resposta imunitária forte e duradoura com uma população celular dominante Th1 [127].

Na Europa está apenas disponível comercialmente uma vacina contra a LCan, concretamente CanilLeish®. É composta por proteínas purificadas excretadas ou segregadas por *L. infantum* (LiESP) e tem como adjuvante uma fração altamente purificada da saponina *Quilaja saponária* [128]. As ESP são proteínas excretadas ou segregadas por vários protozoários que apresentam diversas funções e propriedades das quais revelam interesse nesta matéria a sua contribuição na infecção das células-alvo do hospedeiro pelo parasita e subsequente multiplicação intracelular, como também desempenham um papel relevante na modulação da resposta imunitária conduzida pelo hospedeiro infetado. Muitas destas proteínas são também encontradas na superfície celular das formas de *Leishmania*, o que juntamente com a sua capacidade na estimulação da proliferação de linfócitos T faz com que sejam alvos antigénicos e imunogénicos desejáveis, no sentido de obter uma resposta profilática adequada (128,129). Esta vacina utiliza como adjuvante a QA-21, sendo uma saponina altamente purificada capaz de estimular a proliferação de linfócitos Th1 e linfócitos T citotóxicos, o que a torna o adjuvante ideal para as vacinas contra agentes patogénicos intracelulares. A vacinação com CaniLeish® está aconselhada para os cães a partir dos 6 meses, e a primovacinação consiste na administração de três doses vacinais com um intervalo de 3 semanas entre as administrações. Posteriormente, os cães são revacinados anualmente [131].

Estudos demonstraram a capacidade desta vacina induzir uma resposta imunitária, composta principalmente pela população celular Th1 a partir da terceira semana após a primeira administração vacinal [128]. Outro estudo constatou que esta resposta imunitária

dura pelo menos até um ano depois [132]. Um estudo de campo numa zona altamente endêmica, realizado durante 2 anos, evidenciou uma eficácia de 68,4% e uma proteção de 92,7%. Outro fato constatado neste estudo foi que a ocorrência de casos positivos no exame de PCR foi semelhante em animais vacinados e não vacinados, mas a percentagem de animais que obtiveram posteriormente um resultado negativo no mesmo exame foi maior nos animais vacinados [133]. Foi também descrito que o uso de protocolos vacinais contra a LCan reduz a intensidade de infecção por *L. infantum* em *P. perniciosus*, tendo este facto particular relevância no controlo epidemiológico desta doença [134].

CASOS CLÍNICOS

Caso clínico nº 1 - Rex

Identificação do animal:

O Rex (Figura 7), um cão inteiro de raça indeterminada, com aproximadamente 3 anos, apresenta-se à consulta no dia 26 de dezembro de 2014, na clínica veterinária VetPóvoa.

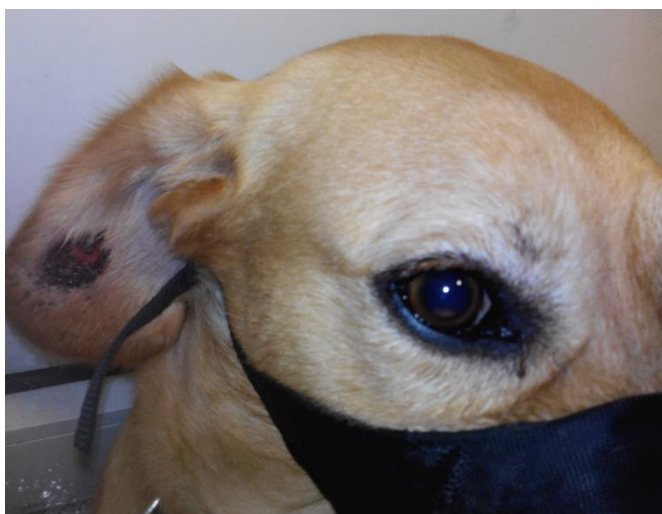


Figura 7: Rex no primeiro dia de consulta

Anamnese e Exame físico/ motivo da consulta:

O animal foi apresentado à consulta devido a uma lesão ulcerada no pavilhão auricular no ouvido direito que persistia há vários meses sem cicatrizar. Esta lesão é mostrada na Figura 7. Foi possível observar outra lesão semelhante no codilho no lado direito, conforme se visualiza na Figura 8.

Apesar das lesões evidenciadas, o animal aparentou estar em boas condições sanitárias e não foi referida qualquer outra manifestação por parte do proprietário. No decorrer do exame físico não foram também detetadas quaisquer outras alterações.

Dados laboratoriais básicos:

Conforme é possível visualizar nas Tabelas 2 e 3 (Anexo I) os parâmetros bioquímicos analisados estavam dentro do intervalo dos valores de referência

Exames complementares

Pelo caráter crónico, tipo de lesões, neste caso ulceradas e pela localização das mesmas suspeita-se que na sua etiologia esteja implicada *Leishmania*, pelo que foi efetuado o teste serológico quantitativo através da técnica de IFI.

Os resultados obtidos neste exame revelaram a presença de um título elevado de anticorpos específicos contra *Leishmania*, cujos resultados na titulação podem estar compreendidos de 640 a 1280. Este título de anticorpos excede em 8 vezes o título limiar de positividade adotado pela generalidade dos laboratórios (80).



Figura 8: Lesão ulcerada no codilho direito

Diagnósticos diferenciais

Causas infecciosas como: pioderma bacteriano profundo por foliculite ou furunculose e demodicose; causas metabólicas como: calcinosis cutis (hiperadrenocorticism); uremia/ insuficiência renal; causas neoplásicas como linfoma epiteliotrópico e carcinoma de células escamosas; agentes físicos ou químicos como: reações medicamentosas ou queimaduras; causas autoimunes como: lupus eritematoso discoide, e lupus eritematoso cutâneo vesicular.

Tratamento

Após confirmado o diagnóstico de Lcan e evidenciação dos resultados dos dados laboratoriais dentro dos valores normais, o paciente iniciou, no dia 16 de janeiro de 2015, 21 dias após a primeira consulta, o protocolo terapêutico consistindo na administração de antimoniato de meglumina (Glucantime®), sob o regime de administração de 100 mg



Figura 9: Primeiro dia tratamento

/kg, SC durante 21 dias juntamente com a administração de alopurinol (Zyloric®), PO, 20mg/kg, BID. Foi também

administrado um estimulante imunitário, nomeadamente o Inmodulen® ao primeiro, terceiro e sétimo dias após início do protocolo terapêutico. Este estimulante imunitário consiste numa solução farmacológica contendo 25 mg de células de *Propionibacterium granulosus*, juntamente com 2 mg de lipopolisacárido de *Escherichia.coli* num excipiente constituído por 100 ml de água destilada.

No decorrer da instituição do protocolo terapêutico as lesões foram sendo debeladas e regredindo. Nas figuras 10, 11 e 12 evidencia-se a evolução da resolução da lesão ulcerada no pavilhão auricular direito ao longo do protocolo terapêutico. Especialmente nas fases finais é possível observar uma lesão nodular, que pode ser compatível com o característico “cancro de inoculação” por vezes evidenciado nas lesões cutâneas, como previamente referido na revisão bibliográfica.



Figura 10: Quatro dias após o início do tratamento (20 de janeiro de 2015)

Figura 11: Sexto dia após o início do tratamento (22 de janeiro de 2015)





Figura 12: Oito dias após o início da terapia (24 de janeiro de 2015)

Monitorização do tratamento

O Rex foi sujeito a reavaliação 2 meses após o término do tratamento, e não apresentou alterações nos resultados do exame físico. Alguns dados bioquímicos foram analisados nomeadamente um proteínograma, ou quantificação das proteínas séricas, mas não se registaram alterações dos parâmetros analisados. Os resultados dos testes analíticos efetuados estão expostos na Tabela 6 (Anexo I).

Caso clínico nº 2 – Danko

Identificação do animal:

O Danko (Figura 13), um cão inteiro de raça Dálmata, com aproximadamente 9 anos, apresenta-se à consulta no dia 4 de Março de 2014, no Hospital Veterinário Abros, em Ourense, Espanha.

Motivo da consulta:

Este animal foi remetido por uma clínica veterinária externa, localizada nas regiões limítrofes da cidade de Ourense, e começou a ser



Figura 13: Danko no primeiro dia de consulta

seguido neste local devido a episódios de diarreia, primariamente de consistência líquida e posteriormente mucoides. Após instituição terapêutica nesta clínica o seu estado clínico melhorou durante alguns dias, contudo posteriormente regressou à mesma clínica apresentando-se prostrado, com febre, vômitos e perda de peso. No mesmo local foi sujeito a um protocolo terapêutico englobando a utilização de duas administrações de dipropionato de imidocarbe (Imizol®), dexametasona (Deyanil®) e vitaminas. Foi administrado dipropionato de imidocarbe devido à existência de vários casos de babesiose na região e uma vez que as manifestações clínicas apresentadas pelo animal também coincidem com esta doença. Após as administrações o animal apresentava melhorias no seu estado clínico, mas voltava a piorar e apresentar febre alguns dias depois. Posteriormente os proprietários indicaram que o animal apresentava desconforto ao alimentar-se e na ingestão de água, e que apresentava sialorreia com saliva de aspeto mais espesso que o normal. Mais tarde começaram a ser visíveis lesões na boca, particularmente nos lábios (Figura 15), que se foram estendendo até à região do nariz e peri-ocular (Figura 14).

Exame físico

No decorrer do exame físico constatou-se que este animal se apresentava hipertérmico (40°C), com diminuição da condição corporal, levemente desidratado (5%) e com lesões ulceradas na face interna dos lábios, gengivas e também na língua. O restante exame físico não evidenciou outras alterações além das descritas.

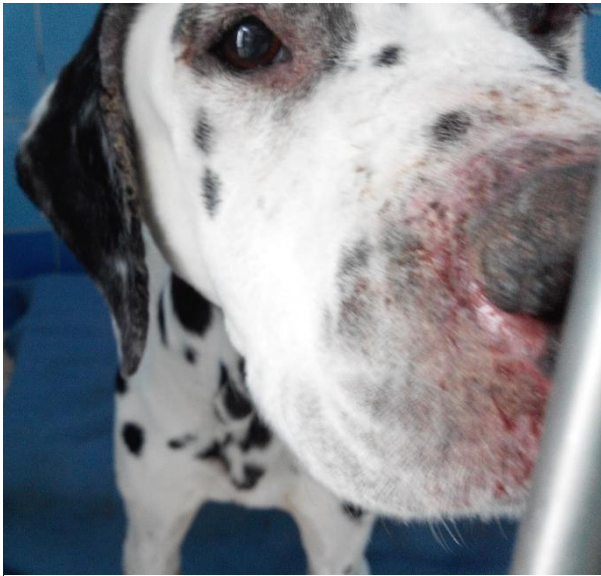


Figura 14: Lesões ulcerocrostosas na região perinasal e periocular



Figura 15: Lesões ulceradas na região perinasal e nos lábios

Diagnósticos diferenciais:

Primariamente a suspeita inicial foi de que o animal poderia ter ingerido um agente cáustico que lhe tivesse provocado inicialmente a diarreia e depois lesões orais. Contudo, a evolução das lesões e distribuição posterior em outros locais como na região do nariz (Figura 14), periocular e pavilhão auricular (Figura 16) sugeriu outras causas, nomeadamente Lcan, e doenças auto-imunes como pemphigus vulgaris ou lupus eritematoso multi-sistémico (LES).

Exames complementares (dados laboratoriais básicos)

Numa primeira abordagem o animal foi sujeito à realização de análises de parâmetros bioquímicos e hemograma, cujos resultados se encontram nas Tabelas 7 e 8 (Anexo II) respetivamente. Apresentou um ligeiro aumento de enzimas hepáticas, nomeadamente da fosfatase alcalina e da gama-glutamil-transferase (GGT) como também do colesterol. Apresentou também um ligeiro aumento das proteínas totais séricas como um rácio albuminas/globulinas reduzido.



Figura 16: Lesões ulcerocrostosas na face interna do pavilhão auricular direito

Biópsia das lesões

No sentido de avaliar e caraterizar as lesões dermatológicas evidenciadas, o animal foi sedado e sujeito a recolha de amostras das lesões cutâneas presentes, nomeadamente na boca (pele e mucosa), nariz e região periorbital. O exame histopatológico das lesões revelou a presença de acantose do estrato espinhoso da epiderme com hipergranulose e hiperqueratose ortoqueratótica ligeira a focalmente moderada. Na superfície das lesões evidenciaram-se crostas serocelulares constituídas por neutrófilos e piócitos. Focalmente, em alguns locais foi possível observar áreas de exocitose de neutrófilos através da epiderme com presença de espongiose. Na derme superficial observou-se um intenso infiltrado inflamatório de padrão difuso constituído por macrófagos, linfócitos, células plasmáticas, neutrófilos e um menor número de leucócitos polimorfonucleares eosinófilos. Os folículos pilosos apresentaram atrofia com queratose folicular e marcada atrofia do complexo glandular periadnexal. Não foi possível a visualização de agentes infecciosos nomeadamente fúngicos ou parasitários, nem através de técnicas rotineiras de visualização, nem com técnicas mais avançadas como PAS (ácido periódico de Schiff) ou coloração Giemsa.

O diagnóstico destas lesões caraterizou-as como dermatite hiperplásico- crostosa, difusa e periadnexal. A observação das crostas serocelulares na superfície, juntamente com a presença de neutrófilos indicaram um pioderma superficial com necessidade de

controle clínico. Contudo, o quadro inflamatório das lesões era completamente



Figura 17: Lesões ulceradas na região perinasal e periocular

inespecífico e de caráter crônico. Não obstante, a presença de um elevado número de células plasmáticas perivasculares e periadnexais tornava recomendável a realização de outras técnicas complementares de diagnóstico para descartar a relação deste processo com uma forma atípica de leishmaniose, apesar da ausência de formas

amastigotas de *Leishmania* spp.

A localização e tipo de lesões cutâneas apresentadas podem também ser partilhadas com outras condições patológicas, nomeadamente de caráter autoimune, e neste sentido foi também realizada uma pesquisa para presença e quantificação de anticorpos anti-nucleares (ANA), no sentido de descartar a presença de LES, a qual se mostrou negativa.

Descartada a presença de LES e devido aos resultados inconclusivos da biopsia, as amostras das lesões foram sujeitas ao teste de pesquisa molecular de *Leishmania* spp. por PCR, e foi instituído empiricamente o protocolo terapêutico para leishmaniose até confirmação do diagnóstico de Lcan.

Tratamento

O protocolo terapêutico para leishmaniose foi iniciado no dia 12 de março de 2015, 8 dias após a primeira consulta, e consistiu na administração de antimoniató de meglumina (Glucantime®), na dose de 100 mg /kg, SC durante 1 mês, juntamente com a administração de alopurinol, PO, 20mg/kg, BID. Foi-lhe também administrado enrofloxacina (Baytril®) e sucinato sódico de metilprednisolona (Solu-medrol®), SC, 1 mg/kg, SID, no sentido da resolução das lesões cutâneas, juntamente com tratamentos locais com clorhexidina e pomada Dermoscent®.

No dia 19 de março de 2015, 15 dias após a primeira consulta, a administração de corticoesteroides, nomeadamente Solu-medrol® foi descontinuada.

O diagnóstico de Lcan foi confirmado no dia 24 de março de 2015, 12 dias após início do tratamento, pela receção do resultado positivo ao teste de PCR previamente requisitado.

Durante este período, o animal permaneceu em casa juntamente com os proprietários, os quais cumpriram o protocolo terapêutico instituído no hospital, permanecendo em contato telefónico frequente com os médicos veterinários responsáveis. Pelos proprietários foram constatadas melhorias do estado clínico que indicaram estar o animal a debelar as lesões, com atividade normal, com apetite e ingestão de água normal.

Monitorização do tratamento

O animal regressou ao hospital, no dia 02 de abril de 2015, 21 dias após o início do tratamento, para monitorização do tratamento e revisão das condições clínicas anteriormente apresentadas. Os proprietários referiram que nesse dia o animal se apresentou mais deprimido comparativamente aos dias anteriores e que demonstrou também manifestações articulares, nomeadamente claudicação intermitente juntamente com edema do focinho. Foi-lhe realizado um exame hematológico, e análise de esfregaço sanguíneo, simultaneamente com um exame ecográfico da cavidade abdominal. O exame ecográfico não revelou alterações importantes, com a exceção da evidência de prostamegália com presença de alguns quistos prostáticos de pequenas dimensões (< 1 cm) e zonas heterogénicas no parênquima do mesmo órgão. Os resultados do hemograma estão expostos na Tabela 10 (Anexo II). Estas alterações negativas relativamente ao estado clínico do animal podiam estar relacionadas com um pico de febre decorrente da Lcan, mas também poderia existir alguma infeção concomitante.

No dia seguinte (03 de abril de 2015), o animal regressou ao hospital para reavaliação do seu estado clínico e foi-lhe retirada, por cistocentese, uma amostra de urina para análise, cujos resultados se encontram expostos na Tabela 9 (Anexo II). Apenas a densidade (1,018) e o pH (7) estavam alterados, com os outros parâmetros existentes na tira de urina estando dentro dos limites normais bem como se verificava ausência de sedimento. Foi também sujeito a um teste serológico, nomeadamente um “kit” de teste de imunocromatografia rápido (Snap 4Dx®) para pesquisa de outros agentes patogénicos que poderiam existir concomitantemente, mas os resultados foram negativos para todos os agentes patogénicos testados, nomeadamente *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi* *Anaplasma* spp, e *E.canis*.

No dia 05 de abril de 2015, 24 dias após início do tratamento, o animal voltou para reavaliação e manifestou deterioração do seu estado clínico e condição corporal, concretamente apresentou-se mais prostrado, com anorexia, alterações locomotoras, neste caso apresentando uma “marcha rígida”, com dificuldades em permanecer em estação e apresenta as articulações dolorosas e quentes ao toque. Foi novamente sujeito à realização de análises hematológicas, cujos resultados estão expostos no Tabela 11 (Anexo II). A anemia evidenciada anteriormente agravou-se (29,8%) e continuou a apresentar leucocitose (29,06 K/ μ L) por neutrofilia (25,53 K/ μ L). A alta concentração plaquetária continuou também elevada (621 K/ μ L).

No dia 07 de abril de 2015, 26 dias após início do tratamento, os proprietários decidiram optar pela eutanásia do animal, em virtude da nova recaída e consequente agravamento do estado clínico do animal, como também devido à indisponibilidade económica e anímica dos mesmos no sentido de continuarem a terapia.

Caso clínico nº 3 – Brandán

Identificação do animal:

O Brandán (Figura 18), um cão inteiro de raça Pastor Alemão, com aproximadamente 9 anos de idade, apresentou-se à consulta no dia 23 de fevereiro de 2015, no Hospital Veterinário Abros.

Motivo da consulta

O Brandán apresentou-se à consulta devido essencialmente à presença de lesões cutâneas evidentes e de perda de peso. Os proprietários referiram ainda que o animal vinha tendo um comportamento diferente nas últimas semanas, nomeadamente a nível social, apresentando-se mais prostrado e distante do ambiente familiar.



Figura 18: Brandán na primeira consulta

Exame físico

Apresentou ligeiro aumento da temperatura corporal (39,2° C). Foram também perceptíveis lesões cutâneas evidentes localizadas nas extremidades auriculares, codilhos e na região externa das extremidades das asas do íleo. Foi também perceptível um ligeiro aumento dos gânglios linfáticos poplíteos e um crescimento exagerado das unhas (onicogrifose), conforme é possível observar na Figura 19. Excetuando os factos descritos, não foram observadas outras alterações relevantes no restante exame físico realizado. As lesões cutâneas evidenciadas externamente são visualizáveis nas Figuras 20, 21, 22 e 23.



Figura 19: Onicogrifose



Figura 20: Lesão ulcerada na extremidade auricular direita



Figura 21: Lesão ulcerada na extremidade auricular esquerda



Figura 22: Lesão ulcerocrostosa nas saliências ósseas (asas do íleo)



Figura 23: Lesão ulcerocrostosa nas saliências ósseas (codilho esquerdo)

Diagnósticos diferenciais

Causas infecciosas como: pioderma bacteriano profundo por foliculite ou furunculose e demodicose; causas metabólicas como: calcinosis cutis (hiperadrenocorticismo); uremia/ insuficiência renal; causas neoplásicas como linfoma epiteliotrópico e carcinoma de células escamosas; agentes físicos ou químicos como: Reações medicamentosas ou queimaduras; causas auto-imunes como: lupus eritematoso discoide e, lupus eritematoso cutâneo vesicular.

Exames complementares (Dados laboratoriais básicos)

Em virtude de avaliar todas as condições clinico-patológicas frequentemente associadas a esta doença o animal foi sujeito à realização de análises bioquímicas e hematológicas, cujos resultados estão expostos nas Tabelas 12 e 13, respetivamente (Anexo III).

Foi realizado um exame citológico das lesões cutâneas apresentadas e foram visualizadas células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, e também cocos e bacilos, mas não foram visualizadas formas amastigotas de *Leishmania*.

Foi também realizado um teste rápido de imunocromatografia para *Leishmania*, o qual revelou um resultado positivo. Foram também remetidas para o laboratório interno amostras serológicas para realização do teste serológico ELISA, e outra amostra serológica para realização de IFI, em laboratório externo.

Como terapia após a primeira consulta é lhe instituída predisona 30 mg, PO, SID e Tsefalen® (cefalexina) 1000mg BID.

No dia 27/02 o resultado de ELISA (Leiscan® ELISA) apresentou positividade muito alta (equivalente a título de anticorpos superior a 1/1280).

O teste de IFI manifestou também um resultado positivo alto, correspondendo a positividade no teste de IFI entre as titulações de 1/160 e 1/320, o que confirma o diagnóstico de LCan.

No dia 03 de Março de 2015, 8 dias após a primeira consulta, o animal regressa ao hospital sob o intuito da realização de um proteinograma sanguíneo. Os resultados desse teste evidenciaram hiperproteinemia e aumento da concentração das globulinas, nomeadamente das alfa e gama-globulinas. Os resultados do proteinograma estão expostos na Tabela 14 (Anexo III).

Tratamento:

Após confirmação de infecção clínica por *Leishmania* foi instituído o protocolo terapêutico utilizando a combinação de antimoniato de meglumina com alopurinol.

No dia 03 de março de 2015, 8 dias após a primeira consulta, foi-lhe instituído o protocolo terapêutico consistindo na administração de antimoniato de meglumina (Glucantime®), na dose de 100 mg /kg, SC durante 1 mês juntamente com a administração de Alopurinol, PO, 20mg/kg, BID. A dose de corticoesteroides anteriormente instituída foi reduzida para a administração de 50% de prednisona a cada 2 dias, durante mais 6 dias.

No dia 11 de março de 2015, 8 dias após início do tratamento, o animal foi trazido ao hospital para monitorização da terapia e estado clínico. No exame físico foi constatada uma melhoria significativa das lesões cutâneas previamente manifestadas. Foi também realizado um hemograma e análises bioquímicas, que revelaram que os parâmetros avaliados estavam dentro dos valores normais.

No dia 02 de abril de 2015, 30 dias após início do tratamento, é terminada a administração de antimoniato de meglumina, e foi referida uma melhoria significativa do estado clínico do Brandán por parte dos proprietários.

Monitorização do tratamento

No dia 28 de maio de 2015, sensivelmente 3 meses após o término do protocolo terapêutico, o Brandán regressou ao hospital, para monitorização do seu estado clínico e realização de proteinograma sanguíneo. As lesões estavam completamente debeladas e os resultados do proteinograma foram significativamente melhores, nomeadamente houve reversão da hipoalbuminemia e aumento do rácio das albuminas e globulinas, conforme é possível, observar na Tabela 15 (Anexo III).

DISCUSSÃO:

A LCan é uma doença que aparenta estar disseminada por todo o território nacional, mas existe ainda a definição “clássica” de três zonas tradicionalmente endêmicas, como Trás-os-Montes e Alto Douro, região metropolitana de Lisboa e o Algarve [46]. Contudo, a doença é encontrada por todo o território continental português, e num estudo efetuado em 2009, foi encontrada uma prevalência de infeção de 6,31% nos canídeos dos 18 distritos nacionais [135].

Durante o período de 4 meses de estágio por mim realizado na área de clínica de animais de companhia, observei o acompanhamento clínico de três casos de LCan, sendo um dos casos acompanhados na clínica veterinária em Coimbra (VetPóvoa) e os outros dois no hospital veterinário em Ourense, Espanha (Abros). No distrito de Coimbra foi registado no estudo realizado em 2009 uma seroprevalência de 6,43% de infeção canina por *Leishmania*, e na região de Ourense em 2011 foi detetada uma prevalência de 35,6% (36,134).

As manifestações clínicas evidenciadas nos três casos foram variadas e com gravidade diferente entre os animais doentes, coincidindo com a diversidade e consequente inespecificidade dos sinais clínicos dos animais que padecem de infeção por LCan, conforme descrito na literatura científica e resumido nesta dissertação. Variaram desde a apresentação de uma lesão cutânea ulcerada no interior de um pavilhão auricular (caso clínico nº 1 Rex), sem presença de qualquer outro sinal clínico adicional, com também ausência de alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, até lesões cutâneas mais extensas e de maior gravidade e com alterações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos graves (caso clínico nº 2 - Danko).

O Danko e o Brandán foram trazidos à consulta devido à perceção por parte dos proprietários de um estado letárgico, com prostração, vómitos, diarreia, anorexia, perda de peso, onicogribose e lesões cutâneas ulceradas. Estas coincidem com as alterações mais comumente referidas pelos proprietários dos animais trazidos à consulta com diagnóstico positivo de LCan, como fraca condição corporal, atrofia muscular generalizada, linfadenomegalia e lesões cutâneas (42,78). Os mesmos animais mostraram outros sinais clínicos, não relatados pelos proprietários como linfadenomegalia, febre e patologia articular. Estudos realizados na região sul de Itália relataram linfadenomegalia em 88,7% dos animais, enquanto em 4% dos casos de LCan é possível a ocorrência de febre resistente a antibioterapia, como também de patologia articular (42,88).

Todos os animais dos casos descritos nesta dissertação apresentaram lesões cutâneas, o que sucede em aproximadamente em 80-90% dos animais com LCan. No entanto, a ocorrência de lesões cutâneas ulceradas sucede apenas em 15 a 40% dos casos e têm como localizações habituais as extremidades auriculares, pontos de pressão, membros posteriores e junções mucocutâneas, normalmente devido a lesões traumáticas ou com origem vascular [6]. A localização das lesões ulceradas apresentadas por todos os animais trazidos à consulta coincidiu com as localizações habituais das lesões ulceradas anteriormente referidas na revisão da literatura. O caso clínico nº 3 – Brandán, apresentou também um crescimento exagerado das unhas (onicogrifose), o que segundo estudos efetuados pode ocorrer em 20 a 31% dos animais com LCan [78].

A perda de peso é também um dado frequente nos cães doentes com LCan, ocorrendo em cerca de 10 a 48% dos animais apresentados na consulta[6]. Pode ter origens diversas, entre as quais a anorexia, competição pelos nutrientes do hospedeiro por parte do parasita, absorção intestinal reduzida e lesão crónica renal [6].

A presença de manifestações digestivas, principalmente diarreia, foi referida como ocorrendo em cerca de 3% dos animais consultados [42] e deve-se sobretudo à destruição da mucosa intestinal especialmente do cólon, causando uma redução da área da superfície de absorção [89]. A presença deste tipo de manifestações ocorreu apenas no caso clínico nº 2 (Danko).

O Danko, no decorrer do tratamento, apresentou também alterações da marcha, nomeadamente manifestava uma marcha rígida e juntamente com dor e aumento de temperatura nas articulações. Segundo outros estudos, as alterações da marcha ou da locomoção, estão presentes em 45% dos animais com LCan clínica [78]. Estas têm diversas origens nomeadamente no tecido muscular (miosites), tecido nervoso (paresia, neuralgia), mas devem-se principalmente a lesões no tecido ósseo e articulações [75].

A abordagem diagnóstica aos três casos foi realizada de forma integrada, atendendo desde a história clínica pregressa dos animais, manifestações relatadas por parte dos proprietários e no decorrer do exame físico, da análise das alterações laboratoriais básicas presentes e dos resultados de testes laboratoriais específicos [93]. Nos três animais foram efetuadas as seguintes análises laboratoriais: bioquímica sérica, hemograma, proteinograma, serologia e análise de pesquisa molecular.

No que se refere aos resultados dos testes laboratoriais básicos foram detetadas as seguintes alterações nos parâmetros bioquímicos: hiperproteinemia, hipercolesteronemia, hiperglicemia, hipercalemia e alterações das enzimas hepáticas

séricas nomeadamente GGT e fosfatase alcalina, constituindo alterações bioquímicas reveladas com maior e menor frequência nos cães com LCan [95].

As alterações hepáticas revelam uma contribuição para alguns sinais clínicos manifestados nos cães doentes, mas raramente evoluem até ao estágio de insuficiência hepática[6]. Dos três animais referidos no estudo, apenas o Danko (caso clínico nº 2) apresentou as referidas alterações dos parâmetros de avaliação da função hepática, nomeadamente apresentando aumento da fosfatase alcalina (131 U/L) e da GGT (10 U/L). Contudo foram alterações ligeiras, sem aparente significado clínico.

A hipoalbuminemia e hiperglobulinemia são referidas como as alterações bioquímicas clássicas (“Hallmark”) nos cães doentes com leishmaniose [6]. Estas alterações não foram evidenciadas no caso clínico nº 1 (Rex), contudo nos restantes casos clínicos apresentados foram observadas hiperproteinemia, rácio das albuminas/globulinas reduzido (0,54 no Danko e 0,38 no Brandán; valor limiar: 0,59 – 1,11) e aumento da concentração das globulinas, sendo estas alterações frequentes dos parâmetros bioquímicos encontradas nos cães com LCan clínica [95]. Não obstante, no Brandán verificou-se um aumento da concentração das gama-globulinas como também das alfa-globulinas, sendo que na bibliografia está referido que este aumento ocorre principalmente nas gamas e beta- globulinas[95].

É de referir a ausência de alterações dos parâmetros bioquímicos de avaliação da função renal, como BUN e CRE, em todos os animais presentes no estudo. Foi descrita elevada prevalência de lesões renais nos cães com leishmaniose, estando presentes alterações neste órgão em praticamente todos os animais doentes, mas isso não sucedeu nos três animais referidos nesta dissertação [78].

A análise hematológica revelou as seguintes alterações nos animais referidos no presente estudo: anemia, leucocitose e neutrofilia. A anemia está presente na maioria dos animais que desenvolvem LCan clínica, sendo a alteração hematológica mais frequente nesta doença [6]. É devida especialmente a lesão crónica renal e consequente diminuição da eritropoiese, podendo ser agravada quando existe perdas sanguíneas e hemólise devido à produção de auto-anticorpos e imunocomplexos (6,78). Nos animais referidos nesta dissertação apenas o Danko revelou anemia na análise hematológica. Este animal apresentou também neutrofilia na análise hematológica, que pode ser explicada por infeção secundária das extensas lesões ulceradas por ele manifestadas.

No sentido de confirmar o diagnóstico de LCan, foi realizada serologia quantitativa anti-Leishmania nos três casos clínicos, através do recurso à técnica de IFI

realizada num laboratório externo. Esta técnica é amplamente utilizada para o diagnóstico de LCan na prática clínica, e é descrita pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) como o teste serológico de referência para o diagnóstico de leishmaniose [93]. Este método é também útil para a monitorização do tratamento, sendo recomendado a realização de um exame serológico, no mesmo laboratório, 6 meses após o início do tratamento [83].

O Rex foi um caso de LCan de certo modo peculiar, pois apenas apresentou um único sinal clínico, uma lesão cutânea ulcerada no pavilhão auricular direito. O facto de existir uma lesão cutânea sem mostrar sinais de cicatrização desde sensivelmente 2 meses antes da sua apresentação na clínica veterinária, trouxe a suspeita de LCan aos clínicos responsáveis por este animal. A abordagem diagnóstica foi conduzida apenas pela análise da presença e quantificação de anticorpos específicos para *Leishmania* através da técnica de IFI devido a restrições financeiras por parte dos proprietários.

O resultado do teste apresentou positividade nas diluições de 1/640 a 1/1280. O valor limiar de deteção neste laboratório encontra-se entre as diluições de 1/80 a 1/160, pelo que o resultado do teste evidenciado neste animal se encontrou 4 vezes superior ao valor limiar de deteção, definindo-se assim que este animal apresenta um título muito alto de anticorpos específicos para *L.infantum*. É consensual na comunidade científica definir que um animal apresenta um título elevado de anticorpos quando os valores apresentados se encontram 2 a 4 vezes superiores ao título limiar de deteção definido no laboratório que realiza o teste. A definição de um baixo título de anticorpos ocorre quando os valores obtidos no teste são iguais ou 2 vezes superiores ao título limiar de deteção [93].

A deteção de anticorpos específicos indica que existiu um contato por parte do animal com o agente parasitário. Um título de anticorpos baixo revela que existiu exposição a *Leishmania*, contudo geralmente sem presença de manifestações clínicas associadas a LCan. Um título alto está normalmente associado a animais que desenvolvem doença clínica, podendo também estar presente em alguns animais infetados subcl clinicamente, ou seja, sem a presença de doença associada a LCan, o que se parece enquadrar neste caso apresentado (Rex - caso clínico nº 1) [102]. Neste caso, pelo título elevado de anticorpos específicos para *Leishmania* pressupõe-se que este animal desenvolveu uma forte imunidade humoral, mas não desenvolveu alterações secundárias a este tipo de reação imunitária, o que seria expectável, pois a deteção de títulos altos de anticorpos específicos ocorre principalmente nos animais que apresentam doença clínica [78].

A detecção de um título alto de anticorpos confirma o diagnóstico de LCan [83] e, como tal, foi instituído ao Rex o protocolo terapêutico utilizando a combinação de antimoniato de meglumina, sob o regime de administração de 100 mg /kg, SC durante 21 dias juntamente com a administração de alopurinol, PO, 20 mg/kg, BID. Este protocolo terapêutico é o que apresenta melhor eficácia no tratamento de LCan, estando descrito na literatura científica como o protocolo de primeira linha no tratamento da doença [83]. O mesmo protocolo terapêutico foi também instituído no caso clínico nº 2 (Danko) e caso clínico nº 3 (Brandán). Para a eleição deste protocolo terapêutico contribuiu também a demonstração da ausência de alterações dos parâmetros bioquímicos de avaliação da função renal, nomeadamente BUN e CRE, pois não é recomendado este protocolo terapêutico a cães com dano renal, devido à toxicidade do antimoniato de meglumina [95].

A evolução do tratamento decorreu favoravelmente nos casos clínicos nº 1(Rex) e nº 3 (Brandán), com a completa resolução e cicatrização das respetivas lesões cutâneas ulceradas após o início do tratamento. O proteinograma do Brandán manifestou também melhorias. O Danko (caso clínico nº 2) após iniciar o protocolo terapêutico obteve também melhorias respetivamente às lesões cutâneas apresentadas, mas o seu estado geral foi-se deteriorando, desenvolvendo nomeadamente anemia e artropatia, o que pressupõe uma multiplicação e disseminação parasitária [83]. Devido à evolução negativa do tratamento aplicado e elevados custos dos mesmos, os proprietários optaram pela eutanásia do animal, após deterioração do seu estado clínico.

A literatura recomenda o controlo das alterações clinicopatológicas associadas à LCan, 1 mês após início da terapia anti-Leishmania, durante 3 a 4 meses até remissão dos sinais clínicos, e posteriormente a cada 6 a 12 meses. Recomenda-se também a realização de serologia quantitativa anti-Leishmania de 6 em 6 meses após a remissão dos sinais clínicos [95].

Nos animais em que o tratamento se manifestou eficaz, particularmente no Rex e no Brandán, foi aconselhado a monitorização do tratamento 1 mês após o seu início, nomeadamente a monitorização dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e realização de proteinograma sanguíneo. Apenas no Brandán foi realizado proteinograma sanguíneo antes do tratamento e posteriormente ao mesmo. Esta análise comprovou a eficácia do tratamento através da diminuição da hiperproteinemia, reversão da hipoalbuminemia e diminuição da concentração das globulinas, especialmente das gama-globulinas.

O controlo no Rex foi efetuado através da análise de determinados parâmetros bioquímicos, nomeadamente mensuração sérica de albuminas, globulinas e proteínas totais, e por também do rácio entre albuminas e globulinas. Tais parâmetros já estariam dentro dos valores normais antes da instituição do tratamento e seguiram dentro da normalidade na mensuração realizada 1 mês após início do mesmo.

Existem alguns fatores concordantes entre os três casos clínicos descritos, que são importantes no risco epidemiológico de LCan, nomeadamente os hábitos de vida dos animais e medidas profiláticas aplicadas. Todos os animais viviam principalmente no exterior, o que facilita o contato com os vetores flebotomíneos, e não recebiam medidas de prevenção ou estas não estavam a ser aplicadas na frequência correta. O Rex e o Brandán realizavam desparasitação externa através de uma solução “spot-on” com uma formulação constituída por 10% de imidaclopride e 50% de permetrina, contudo no primeiro animal esta foi descontinuada em Setembro e no Brandán esta não era aplicada de forma regular. O Danko não recebia qualquer medida profilática, quer por inseticidas de aplicação tópica, coleiras, vacinação ou uso de imunomoduladores (ex: domperidona).

A aplicação regular e adequada das medidas profiláticas é de extrema importância para um controlo e prevenção eficaz de LCan numa população canina. Como já referido, a solução para unção punctiforme (“spot-on”), com a formulação combinada de imidaclopride e permetrina, faculta um efeito repelente eficaz (92,7 – 97,7%) [124], desde 24 horas após a sua administração até 21 dias depois, pelo que a falha na administração mensal e regular pode representar um fator de risco para o contato do parasita com o hospedeiro definitivo [100]. Esta aplicação é especialmente recomendada durante os períodos de maior atividade dos vetores, que na Europa e nomeadamente em Portugal, coincide com os meses de Maio até Outubro. O facto de o Rex ter sido desparasitado externamente apenas no Verão sem a inclusão do mês de Outubro pode ter contribuído para um aumento do risco do contato com o vetor neste período [46]. Tanto o Brandán e o Danko não estariam devidamente protegidos da picada do vetor, devido à aplicação irregular do desparasitante externo no primeiro animal e mesmo completa ausência de proteção no segundo, fatores que podem favorecer o contato com o vetor e respetiva infeção por *L.infantum* [95].

CONCLUSÃO

A LCan é uma doença que suscita preocupação global, especialmente devido ao seu caráter zoonótico e também por o seu agente afetar largos milhões de animais e humanos por todo o Mundo. As alterações climáticas e o trânsito global dos animais são responsáveis pelo surgimento de casos em regiões com ausência de registos da ocorrência desta doença e pelo estabelecimento de novas zonas endémicas, como a região do noroeste de Espanha.

Os cães afetados podem apresentar uma ampla diversidade de sinais clínicos, sendo que nos três animais descritos nesta dissertação foi comum a presença de lesões dermatológicas, nomeadamente lesões cutâneas ulceradas.

A abordagem diagnóstica consistiu na análise integrada das condições clinicopatológicas apresentadas e pela realização de testes serológicos quantitativos específicos. O protocolo terapêutico utilizado consistiu na combinação de antimoniato de meglumina, administrado por via subcutânea durante 21 dias consecutivos, com a administração oral de alopurinol durante um período de 6 meses. Este protocolo terapêutico é classificado como o tratamento de “primeira linha” no combate à LCan.

O tratamento mostrou-se bastante eficaz em dois dos casos presentes no estudo (Rex e Brandán). No entanto, no Danko apenas surtiu algum efeito na resolução das lesões cutâneas ulceradas, e no decorrer do tratamento este apresentou outros sinais clínicos, nomeadamente anemia e artropatia, que se revelaram responsáveis pela deterioração do seu estado clínico.

A monitorização do tratamento após este terminar, nomeadamente através de análises serológicas e de proteinograma sanguíneo, revelou-se também importante nos casos em que o tratamento foi eficaz, no sentido de avaliar possíveis recorrências da doença.

A elevada prevalência desta doença no território nacional implica a necessidade de estimular medidas preventivas por parte dos proprietários dos animais, nomeadamente através da aplicação de inseticidas/repelentes tópicos, vacinação ou administração de domperidona. Estas medidas são importantes não só no sentido de diminuir o risco de infeção de um animal saudável, como também para prevenir o contato de um animal infetado com os vetores flebotomíneos e consequente diminuição do risco de infeção para outros animais e para o homem.

A realização desta dissertação permitiu-me aprofundar os meus conhecimentos teóricos e práticos sobre a LCan, o que será de extrema importância na minha futura

prática clínica no sentido de um melhor reconhecimento dos sinais clínicos desta doença e garantir a melhor abordagem diagnóstica e terapêutica a instituir na sua presença.

BIBLIOGRAFIA

1. Cardoso L, Mendão C, Madeira de Carvalho L. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasit Vectors*. 2012;5 pp 62.
2. Carrera L, Fermín ML, Tesouro M, García P, Rollán E, González JL, et al. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp Parasitol*. 1996;82 pp 139–46.
3. Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, Schallig H, Solano-Gallego L. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet Parasitol*. 2010;174 pp 37–42.
4. Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, et al. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop*. 2008;105 pp 158–65.
5. Campillo MC del, Vázquez FAR. Parasitosis sistémicas - Leishmaniosis canina. *Parasitología Veterinaria*. 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana; 2001. pp 652–65.
6. Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol*. 2009;20 pp 471–89.
7. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. leishvet guidelines. *Parasit Vectors*. 2011;4 pp 86.
8. Cardoso L, Schallig HDFH, Cordeiro-da-Silva A, Cabral M, Alunda JM, Rodrigues M. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;117 pp 35–41.
9. Maroli M, Gradoni L, Oliva G, Castagnaro M, Crotti A, Lubas G, et al. Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2010;236 pp 1200–6.
10. Baneth G, Solano-Gallego L. Leishmaniasis. In: Saunders, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th Editio. 2012. pp 734–49.
11. Strauss-Ayali D, Strauss-Ayali D, Baneth G, Baneth G, Jaffe C, Jaffe C. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet Res*. 2007;38 pp 547–64.

12. Helhazar M, Leitão J, Duarte A, Tavares L, da Fonseca IP. Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra--Portugal. *Parasit Vectors*. 2013;6 pp 88.
13. Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, Cortes S, Campino L, Haralambous C, et al. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2.
14. Campino L, Pratlong F, Abranches P, Rioux J a., Santos-Gomes G, Alves-Pires C, et al. Leishmaniasis in Portugal: Enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop Med Int Heal*. 2006;11 pp 1708–14.
15. Cardoso L, Santos H, Cordeiro-da-Silva A, Pratlong F, Dedet JP, Rodrigues M. *Leishmania infantum* MON-98: Infection in a dog from Alto Douro, Portugal. *Acta Trop*. 2002;83 pp 83–5.
16. Cortes S, Mauricio I, Almeida A, Cristovão JM, Pratlong F, Dedet JP, et al. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitol Int*. 2006;55 pp 277–83.
17. Van Gompel A, Marina Gramiccia, Luigi Gradoni. The leishmaniasis of Southern Europe. *Emerging Pests and Vector-borne Diseases in Europe*. 1^a ed. Wageningen Academic Publishers; 2008. pp 75–95.
18. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*. 2008;158 pp 274–87.
19. Antoniou M, Gramiccia M, Molina R, Dvorak V, Volf P. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill*. 2013;18 pp 2054.
20. Pennisi MG. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution Canine Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*. 2002;39–48.
21. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 2007;145 pp 357–60.
22. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*. 2006;22 pp 552–7.
23. Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2006;28 pp 329–37.
24. Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F, et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *Vet J*. 2009;182 pp 441–5.

25. Maia C, Parreira R, Cristóvão JM, Freitas FB, Afonso MO, Campino L. Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal. *Parasit Vectors*. 2015;8 pp 1–10.
26. Arce a., Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, et al. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*. 2013;18 pp 20546.
27. Pereira MAM. Epidemiologia da leishmaniose canina. *Leishmaniose Canina*. Chaves Ferreira - Publicações; 2008. pp 41–51.
28. Tomás AM, Freitas Romão S. Biologia do Parasita. *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações; 2008. pp 7–26.
29. Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61 pp 530–41.
30. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*. 2002;18 pp 399–405.
31. Sousa S, Lopes AP, Cardoso L, Silvestre R, Schallig H, Reed SG, et al. Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Trop*. 2011;120 pp 82–7.
32. Maia C, Dionísio L, Afonso MO, Neto L, Cristóvão JM, Campino L. *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108 pp 481–7.
33. Cortes S, Afonso MO, Alves-Pires C, Campino L. Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal [6]. *Emerg Infect Dis*. 2007;13 pp 1431–2.
34. Naucke TJ, Menn B, Massberg D, Lorentz S. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res*. 2008;103 pp 65–8.
35. Amusatogui I, Sainz A, Aguirre E, Tesouro M a. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1026 pp 154–7.
36. Miró G, Checa R, Montoya A, Hernández L, Dado D, Gálvez R. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasit Vectors*. 2012;5 pp 60.
37. Teske E, van Knapen F, Beijer EGM, Slappendel RJ. Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. *Acta Vet Scand*. 2002;43 pp 195–201.

38. Miranda S, Roura X, Picado A, Ferrer L, Ramis A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Res Vet Sci*. 2008;85 pp 35–8.
39. Solano-Gallego L, Lull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, et al. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*. 2000;90 pp 37–45.
40. Altet L, Altet L, Francino O, Francino O, Solano-gallego L, Solano-gallego L, et al. Mapping and Sequencing of the Canine. *Society*. 2002;70 pp 2763–71.
41. Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*. 2003;55 pp 23–8.
42. Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*. 1997;141 pp 539–43.
43. Morillas F, Sanchez Rabasco F, Ocaña J, Martin-Sanchez J, Ocaña-Wihelmi J, Acedo C, et al. Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: A survey of the human, dog, and vector. *Parasitol Res*. 1996;82 pp 569–70.
44. Killick-Kendrick R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999;17 pp 279–89.
45. Cardoso L, Solano-Gallego L. Epidemiologia en Europa. Leishmaniosis: Una revisión actualizada. 1st ed. Servet editorial- Grupo Asís Biomedica S.L.; 2013.
46. Branco S, Alves-Pires C, Maia C, Cortes S, Cristovão JMS, Gonçalves L, et al. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Trop*. 2013;125 pp 339–48.
47. Afonso MO, Cardoso L, Anastácio S, Janz JG, Sousa S, Rodrigues J, et al. THE PHLEBOTOMINE SAND FLIES OF PORTUGAL - XI . ECOLOGY OF THE LEISHMANIOSIS VECTORS IN ALIJÓ MUNICIPALITY , ALTO DOURO REGION , 2001 . 2007;14 pp19–22.
48. Maia C, Afonso MO, Neto L, Dionísio L, Campino L. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *J Vector Borne Dis*. 2009;46 pp 268–72.
49. Santos-Gomes GM, Roos Rodrigues O, Marques C. Bioecologia dos vectores. Leishmaniose Canina. Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações; 2008. pp 27–41.
50. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013;27(2) pp 123–47.

51. Brazil RP, Oliveira SMP. Parthenogenesis in the sandfly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). *Med Vet Entomol.* 1999;13 pp 463–4.
52. Léger N, Depaquit J. Les phlebotomes et leur role dans la transmission des leishmanioses. *Rev Française des Lab.* 2001;338 pp 41–8.
53. Bates P a. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007;37 pp 1097–106.
54. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 2006;22 pp 439–45.
55. Naucke TJ, Lorentz S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors.* 2012;5 pp 67.
56. Ferreira MGPA, Fattori KR, Souza F, Lima VMF. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol.* 2009;165 pp 150–4.
57. Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2005;128 pp 149–55.
58. Solano-Gallego L, Rossi L, Scroccaro AM, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors.* 2012;5 pp 98.
59. Salvatore D, Aureli S, Baldelli R, Francesco A Di, Tampieri MP, Galuppi R. Molecular evidence of *Leishmania infantum* in *Ixodes ricinus* ticks from dogs and cats , in Italy. 2014;50 pp 307–12.
60. Dantas-Torres F, Martins TF, Paiva-Cavalcanti M de, Figueredo LA, Lima BS, Brandão-Filho SP. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Exp Parasitol.* 2010;125 pp 184–5.
61. Dantas-Torres F, Latrofa MS, Otranto D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors.* 2011;4 pp 56.
62. Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* 2007;9 pp 1307–15.
63. Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res.* 2010;106 pp 857–60.

64. Colombo F a., Odorizzi RMFN, Laurenti MD, Galati E a B, Canavez F, Pereira-Chiocola VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res.* 2011;109 pp 267–74.
65. Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;160 pp 55–9.
66. Díaz-Espiñeira MM, Slappendel RJ. A case of autochthonous canine leishmaniasis in The Netherlands. *Vet Q.* 1997;19 pp 69–71.
67. Teichmann CE, Da Silva AS, Monteiro SG, Barbosa CF, Barcelos R. Evidence of venereal and transplacental transmission of canine visceral leishmaniasis in southern Brazil. *Acta Sci Vet.* 2011;39 pp 1–5.
68. Gallego LS. Leishmaniosis: Una revision actualizada. Servet editorial- Grupo Asís Biomedica S.L.; 2013.
69. Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2 pp 1–8.
70. Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol.* 2009;25 pp 505–10.
71. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;130 pp 65–74.
72. Gradoni L, Baneth G, Alvar J, Sacks D, Pennisi MG, Desjeux P, et al. Round Table : Scalibor ® ProtectorBand. pp 17–30.
73. Correia JJ, Alexandre-Pires G. Patogenia e lesões da leishmaniose canina. *Leishmaniose Canina.* 1ª ed. Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações; 2008. pp 53–69.
74. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18 pp 293–305.
75. Roze M. Canine Leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. *Eur J Companion Anim Pract.* 2005;15 pp 39–52.
76. Tizzard R. Lymphocytes. *Veterinary Immunology: An introduction.* 7ª ed. Elsevier Health Sciences; 2004. pp 92–105.

77. Koutinas a F, Koutinas CK. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*/chagasi. *Vet Pathol.* 2014;51 pp 527–38.
78. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Trends Parasitol.* 2008;24 pp 324–30.
79. Carrillo E, Moreno J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128 pp 67–70.
80. Panaro M a, Brandonisio O, Cianciulli A, Cavallo P, Lacasella V, Paradies P, et al. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Parasitology.* 2009;136 pp 823–31.
81. Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, Jeronimo SMB, Nascimento ET, Goldman TL, et al. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol.* 2003;170 pp 2613–20.
82. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;112 pp 102–16.
83. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions diagnóstico e terapêutica. *Vet Parasitol.* 2009;165 pp 1–18.
84. Villanueva-Saz S, Solano-Gallego L. Patogénesis y respuesta inmunitaria. *Leishmaniosis: Una revisión actualizada.* 1st ed. Servet editorial- Grupo Asís Biomedica S.L.; 2013.
85. Garcia-Alonso M, Nieto CG, Blanco A, Requena JM, Alonso C, Navarrete I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol.* 1996;18 pp 539–46.
86. Camargo HBDE, Amélia A, Gomes D, Costa DC, Vieira CM, Simões CB, et al. Alterações eletromiográficas e histopatológicas da musculatura de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2012;49 pp 404–13.
87. Santos M, Marcos R, Assunção M, Matos AJF. Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Vet Parasitol.* 2006;141 pp 340–4.
88. Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadoré JL, et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J.* 2001;162 pp 108–20.
89. Pinto AJ, Figueiredo MM, Silva FL, Martins T, Michalik MS, Tafuri WL, et al. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Vet Scand.* 2011;53 pp 67.

90. Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A, et al. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J Comp Pathol*. 2005;132 pp 145–52.
91. Jos R, la Fuente C De, Añor S. Intramedullary spinal cord mass presumptively associated with leishmaniasis in a dog. 2014;244 pp 200–4.
92. Viegas C, Requicha J, Albuquerque C, Sargo T, Machado J, Dias I, et al. Tongue nodules in canine leishmaniosis--a case report. *Parasit Vectors*. 2012;5 pp 120.
93. Paltrinieri S, Solano-gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. 2010; pp 236.
94. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004;57 pp 1–88.
95. Noli C, Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet J*. 2014;202 pp 425–35.
96. Ikeda-Garcia F a., Lopes RS, Ciarlini PC, Marques FJ, Lima VMF, Perri SH V, et al. Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Res Vet Sci*. 2007;83 pp 105–8.
97. Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. Moving towards a solution. *Proc Second Int canine leishmaniasis forum*. 2002;1 pp 7–14.
98. Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(1) pp 82–6.
99. Ikeda-Garcia FA, Lopes RS, Marques FJ, de Lima VMF, Morinishi CK, Bonello FL, et al. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol*. 2007;143 pp 254–9.
100. Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*. 2011;181 pp 23–30.
101. Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*. 2008;24 pp 371–7.
102. Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J*. 2008;175 pp 14–5.

103. Rosypal a C, Troy GC, Duncan RB, Zajac a M, Lindsay DS. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med*. 2005;19 pp 802–9.
104. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays , an Immunofluorescent-Antibody Test , and Two Rapid Tests and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent A. Society. 2005;43 pp 5515–9.
105. Andreadou M, Liandris E, Kasampalidis IN, Taka S, Antoniou M, Ntais P, et al. Evaluation of the performance of selected in-house and commercially available PCR and real-time PCR assays for the detection of *Leishmania* DNA in canine clinical samples. *Exp Parasitol*. 2012;131 pp 419–24.
106. Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte R Della, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2004;125 pp 251–62.
107. Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2006 Apr;137 pp 214–21.
108. Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2002;106 pp 315–24.
109. Miró G, Oliva G, Cruz I, Cañavate C, Mortarino M, Vischer C, et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol*. 2009;20 pp 397–404.
110. Cavaliero T, Arnold P, Mathis a, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med*. 1999;13(4) pp 330–4.
111. Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Billinis C, Koutinas AF, Galatos AD, et al. Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. *Vet Parasitol*. 2005;130 pp 199–205.
112. Lamothe J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract*. 2001;42 pp 170–5.
113. Cortadellas O. Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis. *J Vet Intern Med*. 2003;17 pp 808–12.

114. Athanasiou L V, Saridomichelakis MN, Kontos VI, Spanakos G, Rallis TS. Treatment of canine leishmaniosis with aminosidine at an optimized dosage regimen: a pilot open clinical trial. *Vet Parasitol.* 2013;192 pp 91–7.
115. Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M, Ferrer L. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Prev Vet Med.* 2014;115 pp 56–63.
116. Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J.* 2009;179 pp 259–63.
117. Gomez-Ochoa P, Gascon FM, Lucientes J, Larraga V, Castillo JA. Lactating females Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) show protection against experimental *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol [Internet].* 2003 Aug [cited 2015 Feb 23];116(1) pp 61–4.
118. Miró G, Solano-Gallego L. Manifestaciones clínicas y alteraciones clínico-patológicas. Leishmaniosis: Una revision actualizada. 1st ed. Servet editorial-Grupo Asís Biomedica S.L.; 2013.
119. Torres M, Bardagí M, Roura X, Zanna G, Ravera I, Ferrer L. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J.* 2011;188 pp 346–51.
120. Roura X, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Maroli M, Oliva G, et al. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *Vet J.* 2013;198 pp 43–7.
121. Mazloumi Gavgani a. S, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: A matched-cluster randomised trial. *Lancet.* 2002;360 pp 374–9.
122. Wylie CE, Carbonell-Antoñanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC, et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniosis. Part II: topically applied insecticide treatments and prophylactic medications. *Prev Vet Med.* 2014;117 pp 19–27.
123. Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Solari Basano F, et al. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors.* 2014;7 pp 327.
124. Miró G, Gálvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA, Molina R. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet Parasitol.* 2007;143 pp 375–9.

125. Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, et al. Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet Parasitol.* 2007;144 pp 270–8.
126. Molina R, Espinosa-Góngora C, Gálvez R, Montoya A, Descalzo M a., Jiménez MI, et al. Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*. *Vet Parasitol.* 2012;187 pp 529–33.
127. Gradoni L. Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. *Vet Parasitol.* 2015;208 pp 94–100.
128. Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM, Gueguen S. 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.
129. Rosa R, Rodrigues OR, Marques C, Santos-Gomes GM. Leishmania infantum: soluble proteins released by the parasite exert differential effects on host immune response. *Exp Parasitol.* 2005;109 pp 106–14.
130. Jiménez-Ruiz A, Boceta C, Bonay P, Requena JM, Alonso C. Cloning, sequencing, and expression of the PSA genes from *Leishmania infantum*. *Eur J Biochem.* 1998;251 pp 389–97.
131. Canileish®: Technical Product Profile. Virbac Animal Health; 2011.
132. Martin V, Vouldoukis I, Moreno J, McGahie D, Gueguen S, Cuisinier A-M. The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. *Vet Res.* 2014;45 pp 69.
133. Oliva G, Nieto J, Foglia Manzillo V, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, et al. A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* Transmission Seasons. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8 pp e3213.
134. Bongiorno G, Paparcone R, Manzillo VF, Oliva G, Cuisinier AM, Gradoni L. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish??) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs-A preliminary xenodiagnosis study. *Vet Parasitol.* 2013;197 pp 691–5.
135. Cortes S, Vaz Y, Neves R, Maia C, Cardoso L, Campino L. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol.* 2012;189(2-4) pp 189–96.
136. Cowell RL, Valenciano AC. Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat. Elsevier; 2014.

137. Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho O a., Moreno J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;26(7) pp 341–9.

ANEXOS:

Anexo I: Caso clínico nº 1 – REX

Tabela nº 2: Bioquímica sérica do Rex no dia da primeira consulta (6 de Janeiro de 2015).

<i>Parâmetros bioquímicos</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Creatinina (CRE)</i>	0.9 mg/dl	0.4 – 1.4 mg/dl
<i>Ureia (BUN)</i>	24.3 mg/dl	9.2 – 29.2 mg/dl
<i>ALT</i>	36 U/I	17 – 78 U/I
<i>Fosfatase alcalina (FA)</i>	80 U/I	13 – 83 U/I
<i>Proteínas totais (PT)</i>	6.8 g/dl	5.0 – 7.2 g/ dl
<i>Albumina</i>	3.7 g/dl	2.6-4.9 g/dl
<i>Globulinas</i>	3.1 g/dl	2.9 – 7.7 g/dl
<i>Relação A/G</i>	1.194	0.59 – 1.11

Tabela nº 3: Bioquímica sérica do Rex no dia 16 de Janeiro de 2015 (10 dias após a primeira consulta).

<i>Parâmetros bioquímicos</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Proteínas totais (PT)</i>	6,8 g/dl	5.0 – 7.2 g/ dl
<i>Albumina</i>	3,8 g/dl	2.6-4.9 g/dl
<i>Globulinas</i>	3 g/dl	2.9 – 7.7 g/dl
<i>Relação A/G</i>	1.26	0.59 – 1.11

Tabela 4: Bioquímica sérica do Rex no seu 4º dia de tratamento com Glucantime® (20 de Janeiro de 2015)

<i>Parâmetros bioquímicos</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Creatinina (CRE)</i>	0.8 mg/gl	0.4 – 1.4 mg/dl
<i>Ureia (BUN)</i>	13.2 mg/dl	9.2 – 29.2 mg/dl
<i>ALT</i>	33 U/I	17 – 78 U/I
<i>Fosfatase alcalina (FA)</i>	76 U/I	13 – 83 U/I

Tabela 5: Bioquímica sérica do Rex no seu último dia de tratamento com Glucantime® - 02 de Fevereiro de 2015. Os valores alterados encontram-se marcados a vermelho.

<i>Parâmetros bioquímicos</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Ureia (BUN)</i>	21.5 mg/ dl	9.2 – 29.2 mg/dl
<i>ALT</i>	46 U/I	17 – 78 U/I
<i>AST</i>	62 U/I	17 – 44 U/I

Tabela 6: Bioquímica sérica do Rex no dia 4 de Abril de 2015 (2 meses após o fim do tratamento).

<i>Parâmetros bioquímicos</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Proteínas Totais</i>	6.8 g/ dl	5.0 – 7.2 g/ dl
<i>Albumina</i>	3.8 g/ dl	2.6-4.9 g/dl
<i>Globulinas</i>	3 g/ dl	2.9 – 7.7 g/dl
<i>Rácio A/G</i>	1.26	0.59 – 1.11

Anexo II: Caso clínico nº 2 – DANKO

Tabela nº7: Bioquímica sérica do Danko no primeiro dia de consulta (4 de Março de 2015). Os valores alterados encontram-se marcados a vermelho.

<i>Parâmetros bioquímicos</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Creatinina (CRE)</i>	0.6 mg/dl	0.4 – 1.4 mg/dl
<i>Ureia (BUN)</i>	17.8 mg/dl	9.2 – 29.2 mg/dl
<i>ALT</i>	76 U/l	17 – 78 U/L
<i>Fosfatase alcalina (FA)</i>	131 U/l ↑	13 – 83 U/L
<i>GGT</i>	10 ↑ U/L	1 – 9.7 U/L
<i>Colesterol</i>	450 mg/dl ↑	111 – 312 mg/dl
<i>Fósforo</i>	4.5 mg/dl	1.9 – 5 mg/dl
<i>Cálcio</i>	11.1 mg/dl	9.3 – 12.1 mg/dl
<i>Amilase</i>	850 U/l	226 – 1063 U/l
<i>Bilirrubina</i>	0.5 mg/dl	0.1 – 0.5 mg/dl
<i>Albumina</i>	3 g/dl	2.6 - 4.9 g/dl
<i>Proteínas totais</i>	7.5 g/dl ↑	5.0 – 7.2 g/ dl
<i>Globulinas</i>	4.5 g/dl	2.9 – 7.7 g/dl
<i>Rácio A/G</i>	0.54 ↓	0.59 – 1.1

Tabela nº 8: Hemograma do Danko no primeiro dia de consulta (4 de Março de 2015).

<i>Resultados hemograma</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Leucócitos</i>	7.83 K/μL	5.5-16.9 K/μL
<i>Linfócitos</i>	0.57 K/μL	0.5-4.9 K/μL
<i>Monócitos</i>	0.57 K/μL	0.3-2 K/μL
<i>Neutrófilos</i>	6.61 K/μL	2-12 K/μL
<i>Eosinófilos</i>	0.06 K/μL	0.1-1.49 K/μL
<i>Basófilos</i>	0.02 K/μL	0-0.1 K/μL
<i>Hematócrito</i>	47.6%	37-55 %
<i>Eritrócitos</i>	6.98 M/μL	5.5-8.5 M/μL
<i>Hemoglobina</i>	16 g/dL	12-18 g/dL
<i>Reticulócitos</i>	34.6 K/μL	10-110 K/μL
<i>Índice reticulocitário</i>	15.5% (RDW)	14.7 – 17.9% (RDW)
<i>MCV</i>	68.2 fL	60-77 fL
<i>MCHC</i>	33.6 g/dL	30 – 37.5 g/dL
<i>MCH</i>	22.9 pg	18.5 – 30 pg
<i>PLT</i>	205 K/μL	175 – 300 K/μL

Tabela nº 9: Urianálise do Danko no primeiro dia de consulta (4 de Março de 2015).. Os valores alterados encontram-se marcados a vermelho.

<i>Parâmetros</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valores de Referência</i>
Cor	amarelo intenso	transparente e amarela à inspeção visual
Turbidez	levemente turvo	
Densidade	1.038	(1.030-1.060)
pH	8	(5-7)
Proteinúria	+++	negativo
Glicosúria	negativo	negativo
Corpos Cetónicos	negativo	negativo
Bilirrubina	+++	negativo
Urobilinogénio	negativo	3.2 – 16 µ mol/
Sangue	+++	negativo
Nitritos	negativo	negativo
Análise de sedimento	ausência de cilindros, presença de cristais de urato, e escassa presença de eritrócitos, leucócitos e células epiteliais	-

Tabela nº 10: Hemograma do Danko 21 dias após o início do tratamento (2 de Abril de 2015). Os valores alterados encontram-se marcados a vermelho.

<i>Resultados hemograma</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
Leucócitos	36.6 K/µL ↑↑	5.5-16.9 K/µL
Linfócitos	1.32 K/µL	0.5-4.9 K/µL
Monócitos	2.07 K/µL	0.3-2 K/µL
Neutrófilos	32.73 K/µL ↑↑	2-12 K/µL
Eosinófilos	0.42 K/µL	0.1-1.49 K/µL
Basófilos	0.06 K/µL	0-0.1 K/µL
Hematócrito	32% ↓↓	37-55 %
Eritrócitos	4.8 M/µL ↓↓	5.5-8.5 M/µL
Hemoglobina	11.9 g/dL ↓↓	12-18 g/dL
Reticulócitos	78 K/µL	10-110 K/µL
Índice reticulocitário	16.1% (RDW)	14.7 – 17.9% (RDW)
MCV	66.6 fL	60-77 fL
MCHC	37.1 g/dL	30 – 37.5 g/dL
MCH	24.7 pg	18.5 – 30 pg
PLT	606 K/µL ↑↑	175 – 300 K/µL

Tabela nº 11: Hemograma do Danko 24 dias após o início do tratamento (5 de Abril de 2015). Os valores alterados encontram-se marcados a vermelho.

<i>Resultados hemograma</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Leucócitos</i>	29.06 K/ μ L ↑↑	5.5-16.9 K/ μ L
<i>Linfócitos</i>	1.24 K/ μ L	0.5-4.9 K/ μ L
<i>Monócitos</i>	1.74 K/ μ L	0.3-2 K/ μ L
<i>Neutrófilos</i>	25.53 K/ μ L	2-12 K/ μ L
<i>Eosinófilos</i>	0.36 K/ μ L	0.1-1.49 K/ μ L
<i>Basófilos</i>	0.2 K/ μ L ↑↑	0-0.1 K/ μ L
<i>Hematócrito</i>	29.8% ↓↓	37-55%
<i>Eritrócitos</i>	4.48 M/ μ L ↓↓	5.5-8.5 M/ μ L
<i>Hemoglobina</i>	11.5 g/dL ↓	12-18 g/dL
<i>Reticulócitos</i>	43.7 K/ μ L	10-110 K/ μ L
<i>Índice reticulocitário</i>	16.2% (RDW)	14.7 – 17.9% (RDW)
<i>MCV</i>	66.4 fL	60-77 fL
<i>MCHC</i>	38.6 g/dL ↑	30 – 37.5 g/dL
<i>MCH</i>	25.6 pg	18.5 – 30 pg
<i>PLT</i>	621 K/ μ L ↑↑	175 – 300 K/ μ L

Anexo III: Caso clínico nº 3 – BRANDÁN

Tabela nº 12: Bioquímica sérica do Brandán no primeiro dia de consulta (dia 23 de Fevereiro de 2015). Os valores alterados encontram-se marcados a vermelho.

<i>Parâmetros bioquímicos</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Creatinina (CRE)</i>	0.6 mg/dl	0.4 – 1.4 mg/dl
<i>Ureia (BUN)</i>	26.4 mg/dl	9.2 – 29.2 mg/dl
<i>ALT</i>	55 U/L	17 – 78 U/L
<i>Glucose (GLU)</i>	131 mg/dl ↑	75 – 128 mg/dl
<i>Colesterol (COL)</i>	219 mg/dl	111 – 312 mg/dl
<i>Proteínas Totais</i>	8.5 g/dl ↑	5.0 – 7.2 g/dl
<i>Albumina</i>	3.1 g/dl	2.6 - 4.9 g/dl
<i>Globulinas</i>	6.8 g/dl	2.9 – 7.7 g/dl
<i>Cálcio</i>	10.8 mg/dl	9.2 – 29.2 mg/dl

Tabela nº 13: Hemograma do Brandán no primeiro dia de consulta (23 de Fevereiro de 2015)

<i>Resultados hemograma</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Leucócitos</i>	8.92 K/ μ L	5.5-16.9 K/ μ L
<i>Linfócitos</i>	0.78 K/ μ L	0.5-4.9 K/ μ L
<i>Monócitos</i>	0.52 K/ μ L	0.3-2 K/ μ L
<i>Neutrófilos</i>	6.54 K/ μ L	2-12 K/ μ L
<i>Eosinófilos</i>	0.05 K/ μ L	0.1-1.49 K/ μ L
<i>Basófilos</i>	0.01 K/ μ L	0-0.1 K/ μ L
<i>Hematócrito</i>	38.6%	37-55 %
<i>Eritrócitos</i>	7.2 M/ μ L	5.5-8.5 M/ μ L
<i>Hemoglobina</i>	15 g/dL	12-18 g/dL
<i>Reticulócitos</i>	45.7 K/ μ L	10-110 K/ μ L
<i>Índice reticulocitário</i>	15.6% (RDW)	14.7 – 17.9% (RDW)
<i>MCV</i>	67.4 fL	60-77 fL
<i>MCHC</i>	32.5 g/dL	30 – 37.5 g/dL
<i>MCH</i>	24.6 pg	18.5 – 30 pg
<i>PLT</i>	216 K/ μ L	175 – 300 K/ μ L

Tabela nº 14: Proteinograma do Brandán 8 dias após a primeira consulta (3 de Março de 201). Os valores alterados encontram-se marcados a vermelho.

<i>Proteinograma</i>	<i>Resultados análises</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Proteínas totais</i>	94 g/l ↑	49 - 85 g/l
<i>Albumina</i>	26 g/l ↓	27 - 46 g/l
<i>Alfa – 1 -globulina</i>	2.54 g/l	2 - 5 g/l
<i>Alfa-2-globulina</i>	12.96 g/l	3 - 11 g/l
<i>Beta-1-globulina</i>	6.52 g/l	7 – 13 g/l
<i>Beta – 2 - globulina</i>	9.7 g/l	6 - 14 g/ l
<i>Gamma globulina</i>	13.3 g/l ↑	5 - 12 g/l
<i>Rácio A/G</i>	0.38 ↓	0.7 – 1.9

Laboratório: LabortiVeterinária, Espanha

Tabela nº 15: Proteinograma do Brandán 3 meses após o primeiro dia de consulta (28 de Maio de 2015). Os valores alterados encontram-se marcados a vermelho.

<i>Proteinograma</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valores de referência</i>
<i>Proteínas totais</i>	72 g/l	49 - 85 g/l
<i>Albumina</i>	34.7 g/l	27 - 46 g/l
<i>Alfa – 1 -globulina</i>	1.66 g/l ↓	2 - 5 g/l
<i>Alfa-2-globulina</i>	12.17 g/l ↑	3 - 11 g/l
<i>Beta-1-globulina</i>	6.62 g/l ↓	7 – 13 g/l
<i>Beta – 2 - globulina</i>	7.20 g/l	6 - 14 g/ l
<i>Gamma globulina</i>	9.65 g/l	5 - 12 g/l
<i>Rácio A/G</i>	0.93	0.7 – 1.9

Laboratório: LabortiVeterinária, Espanha