

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

# **Leishmaniose em animais de companhia – estudo de casos clínicos**

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

Catarina das Dores da Cunha Cerqueira

Orientador: Prof. Doutor Luís Cardoso



Vila Real, 2018



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



## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Prof. Doutor Luís Cardoso, pela disponibilidade demonstrada ao longo do estágio curricular e toda a realização deste trabalho.

A toda a equipa do Hospital Veterinário do Restelo e colegas de estágio, pelos conhecimentos transmitidos, dedicação, excelente profissionalismo e espírito de equipa que contribuíram para a minha formação como futura médica veterinária.

Aos meus pais, por todos os valores transmitidos, todo o apoio, paciência e carinho demonstrados durante o meu percurso enquanto pessoa e estudante. Sem vocês, tudo isto não passaria de um sonho de criança. A vós, devo-vos o mundo.

Ao meu irmão, das pessoas mais importantes da minha vida, por ter ajudado a construir a pessoa que sou hoje, que me ensinou desde cedo a pensar diferente, a ter a firmeza necessária para superar qualquer obstáculo e a nunca desistir dos meus sonhos.

Ao Eduardo, por significar muito para mim. Por acreditar em mim, pelo carinho, cumplicidade, paciência, amparo e todos os conselhos. Por ser tanto a minha âncora quando tudo parece estar à deriva, como a onda que me leva sempre para um lugar melhor.

À minha família, em especial aos meus avós maternos e tios, Zé e Lula, por terem acompanhado toda a minha educação e formação, e estarem sempre presentes, nos bons e maus momentos. Ao meu primo Joel, que sempre foi como um irmão, que me ensinou a importância da persistência e dedicação.

Aos meus amigos, de longa data e novos que me ajudaram nestes últimos 6 anos. Por estarem ao meu lado, mesmo que a muitos quilómetros de distância, por me animarem nos dias menos bons, pela boa disposição e partilha. Ao Sr. Matos e D. Lila que tão importantes foram no meu estágio curricular.

Aos meus animais, especialmente à Tasha e ao Ruka, com quem aprendi cedo o que é amar e ser amado por outro ser vivo. Foi um prazer tê-los a meu lado.

A todos vocês, porque momentos felizes não compartilhados, não são felicidade.

## Resumo

A leishmaniose é uma doença zoonótica causada por um agente que é transmitido por um inseto vetor. Uma vez que cão é o reservatório primário e podendo o gato atuar como potencial reservatório secundário, ambos assumem um papel importante na epidemiologia da doença.

A leishmaniose constitui um problema de saúde pública e apesar de todos os esforços e programas de profilaxia implementados pelos profissionais de saúde veterinária, continua a ser uma doença endêmica em várias regiões do globo, nomeadamente em Portugal.

No Hospital Veterinário do Restelo, durante o período de estágio (entre setembro e dezembro de 2017), acompanhei diversos casos clínicos de leishmaniose em animais de companhia que incluo nesta dissertação.

Os cinco casos de leishmaniose canina para um caso de leishmaniose felina foram diagnosticados através da deteção molecular de sequências de ADN de *Leishmania* por PCR, da quantificação do título de anticorpos anti-*Leishmania* por ELISA e IFI, tal como a observação de formas amastigotas de *Leishmania* em citologia ocular. Os protocolos terapêuticos aplicados incluíram alopurinol isolado, combinações de alopurinol com antimoniato de meglumina, e alopurinol com miltefosina. Em todas as situações foram necessárias várias reavaliações e constante monitorização de tratamento e evolução da doença.

Procurei reunir nesta dissertação informação relativa à doença em cães e gatos. Embora a leishmaniose felina não seja uma ocorrência tão frequente, tem vindo a adquirir nos últimos anos importância na prática clínica.

Palavras-chave: leishmaniose, cão, gato, diagnóstico, tratamento, Portugal



## Abstract

Leishmaniosis is a zoonotic disease caused by an agent that is transmitted by an insect vector. Although the dog is the primary reservoir and the cat can act as a potential secondary reservoir, both play an important role in the epidemiology of the disease.

Leishmaniosis is a public health problem and despite all efforts and prophylaxis programs implemented by veterinary health professionals, the disease remains endemic in several regions of the globe, including Portugal.

At Hospital Veterinário do Restelo, Lisbon, during the internship period (between September and December 2017), I followed several clinical cases of leishmaniosis in companion animals, which are described in this dissertation.

Five cases of canine leishmaniosis and a case of feline leishmaniosis were diagnosed by PCR molecular detection of *Leishmania* DNA, titration of anti-*Leishmania* antibodies by ELISA and IFI, and by observation of *Leishmania* amastigotes in ocular smears. The applied therapeutic protocols included isolated alopurinol, combinations of alopurinol with meglumine antimoniate, and allopurinol with miltefosine. In all situations, several reassessments and periodic monitoring of treatment and evolution of the disease were necessary.

I sought to gather information on the disease in dogs and cats in this dissertation. Although feline leishmaniosis is not such a frequent occurrence, it has been gaining importance in clinical practice in recent years.

Key words: leishmaniosis, dog, cat, diagnosis, treatment, Portugal.



## Índice geral

<b>Introdução</b> .....	1
<b>1. Revisão da literatura científica</b> .....	5
<b>1.1. Etiologia</b> .....	5
<b>1.2. Epidemiologia</b> .....	6
<b>1.3. O parasita e o vetor biológico</b> .....	9
<b>1.4. Ciclo de vida</b> .....	10
<b>1.5. Transmissão</b> .....	12
<b>1.6. Fisiopatogenia</b> .....	14
<b>1.7. Sinais clínicos</b> .....	18
a) Cães .....	18
b) Gatos .....	18
<b>1.7.1. Sinais clínicos gerais</b> .....	19
<b>1.7.2. Alterações dermatológicas</b> .....	20
<b>1.7.3. Linfadenomegalia e esplenomegalia</b> .....	23
<b>1.7.4. Alterações renais</b> .....	23
<b>1.7.5. Distúrbios hemostáticos</b> .....	24
<b>1.7.6. Alterações locomotoras</b> .....	25
<b>1.7.7. Lesões oculares</b> .....	26
<b>1.7.8. Lesões neurológicas</b> .....	27
<b>1.7.9. Lesões orais</b> .....	28
<b>1.7.10. Alterações gastrointestinais</b> .....	29
<b>1.7.11. Outros sinais</b> .....	29
<b>1.8. Diagnóstico</b> .....	30
<b>1.8.1. Métodos Diretos</b> .....	30
b) Avaliação citológica e esfregaços .....	32
c) Avaliação histopatológica .....	33
d) Cultura.....	34
e) Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	35
f) Imunohistoquímica (IHQ).....	37
<b>1.8.2. Métodos Indiretos</b> .....	38
a) Imunofluorescência indireta (IFI): .....	38
b) Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).....	39

c) Teste de aglutinação direta (DAT).....	40
d) Imunodeteção (WB).....	41
1.8.3. Outros métodos de diagnóstico.....	41
a) Teste de Montenegro.....	41
b) Xenodiagnóstico .....	42
1.9. Estadiamento e tratamento.....	43
1.9.1. Antimoniais pentavalentes .....	45
1.9.2. Análogos das purinas .....	46
1.9.3. Miltefosina.....	47
1.9.4. Antimoniato de meglumina com alopurinol.....	48
1.9.5. Combinação de miltefosina com alopurinol.....	48
1.9.6. Anfotericina B.....	49
1.9.7. Outros .....	49
1.10. Monitorização .....	52
1.11. Profilaxia .....	53
1.12. Prognóstico.....	54
1.13. Implicações na Saúde Pública .....	55
2. Descrição dos casos.....	57
2.1. Caso clínico nº 1.....	57
2.1.1. Identificação.....	57
2.1.2. História pregressa.....	57
2.1.3. Motivo da consulta .....	57
2.1.4. Anamnese e exame físico.....	58
2.1.5. Diagnósticos diferenciais.....	58
2.1.6. Exames complementares.....	59
2.1.7. Diagnóstico .....	59
2.1.8. Tratamento.....	60
2.1.9. Acompanhamento.....	60
2.2. Caso clínico nº 2.....	63
2.2.1. Identificação.....	63
2.2.2. História pregressa.....	63
2.2.3. Motivo da consulta .....	63
2.2.4. Anamnese e exame físico.....	63
2.2.5. Diagnósticos diferenciais.....	64
2.2.6. Exames complementares.....	64
2.2.7. Diagnóstico .....	66
2.2.8. Tratamento.....	66

2.2.9. Acompanhamento.....	66
2.3. Caso clínico nº 3.....	68
2.3.1. Identificação.....	68
2.3.2. História pregressa.....	68
2.3.3. Motivo da consulta .....	68
2.3.4. Anamnese e exame físico.....	68
2.3.5. Diagnósticos diferenciais.....	69
2.3.6. Exames complementares.....	69
2.3.7. Diagnóstico.....	70
2.3.8. Tratamento.....	70
2.3.9. Acompanhamento.....	71
2.4. Caso clínico nº 4.....	73
2.4.1. Identificação.....	73
2.4.2. História pregressa.....	73
2.4.3. Motivo da consulta .....	73
2.4.4. Anamnese e exame físico.....	73
2.4.5. Diagnósticos diferenciais.....	75
2.4.6. Exames complementares.....	75
2.4.7. Diagnóstico.....	76
2.4.8. Tratamento.....	76
2.4.9. Acompanhamento.....	76
2.5. Caso clínico nº 5.....	79
2.5.1. Identificação.....	79
2.5.2. História pregressa.....	79
2.5.3. Motivo da consulta .....	79
2.5.4. Anamnese e exame físico.....	79
2.5.5. Diagnósticos diferenciais.....	80
2.5.6. Exames complementares.....	80
2.5.7. Diagnóstico.....	81
2.5.8. Tratamento.....	81
2.5.9. Acompanhamento.....	82
2.6. Caso clínico nº 6.....	83
2.6.1. Identificação.....	83
2.6.2. História pregressa.....	83
2.6.3. Motivo da consulta .....	83
2.6.4. Anamnese e exame físico.....	83
2.6.5. Diagnósticos diferenciais.....	85

2.6.6. Exames complementares.....	85
2.6.7. Diagnóstico.....	86
2.6.8. Tratamento.....	87
2.6.9. Acompanhamento.....	88
3. Discussão.....	93
4. Conclusão.....	101
5. Referências.....	103
6. Anexos.....	121
6.1. Anexo I: Caso clínico nº 1.....	121
6.2. Anexo II: Caso Clínico nº 2.....	125
6.3. Anexo III: Caso clínico nº 3.....	127
6.4. Anexo IV: Caso clínico nº 4.....	133
6.5. Anexo V: Caso clínico nº 5.....	136
6.6. Anexo VI: Caso clínico nº6.....	138

## Índice de figuras e tabelas

Figura 1 - Distribuição de LCan provocada por <i>Phlebotomus</i> spp. no continente Europeu (adaptada de Beugnet <i>et al.</i> , 2018).....	6
Figura 2 - Distribuição geográfica de LFel no Novo Mundo (adaptada de <a href="http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en">http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en</a> ).....	7
Figura 3 - Formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> no interior de macrófagos de cão (A) e gato (B), obtidas através de aspirado de linfonodos reativos (coloração de May-Grünwald-Giemsa) (adaptado de Baneth e Solano-Gallego, 2012; Pennisi <i>et al.</i> , 2015). ....	9
Figura 4 - Promastigotas de <i>Leishmania</i> , com núcleo redondo e o cinetopasto (coloração May-Grünwald-Giemsa, x1000) (adaptado de Baneth e Solano-Gallego, 2012). ....	10
Figura 5 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> (adaptado de Beugnet <i>et al.</i> , 2018). ....	11
Figura 6 - Modos de transmissão não vetoriais de <i>Leishmania infantum</i> em cães (adaptado de Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2011). ....	14
Figura 7 - Baixa condição corporal e aspeto de “cabeça de velha” em Boxer diagnosticado com LCan (fotografia de Catarina Cerqueira). ....	20
Figura 8 - Cadela com LCan que apresenta sinais de anorexia, perda de peso, apatia e evidentes lesões dermatológicas não pruriginosas nos membros e região ventral (fotografia de Catarina Cerqueira).....	22
Figura 9 - Podengo português com LCan e mucosas pálidas, sinal clínico de anemia (fotografia de Catarina Cerqueira). ....	25
Figura 10 - Uveíte bilateral com hifema na câmara anterior (A); e descarga de mucosa, equimose e edema difuso do endotélio corneal (B) em gatos com LFel (adaptado de Leiva <i>et al.</i> , 2005; Pennisi <i>et al.</i> , 2015).....	27
Figura 11 - Lesões nodulares na superfície dorsal da língua de cão com LCan (adaptado de Viegas <i>et al.</i> , 2012).....	29
Figura 12 - Abordagem ao diagnóstico de cão com sinais clínicos compatíveis com LCan (adaptado de Baneth e Solano-Gallego, 2012).....	38
Figura 13 - Métodos de diagnóstico mais utilizados para a LCan (adaptado de Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2011).....	42
Figura 14 - Imagem adaptada de Solano-Gallego <i>et al.</i> (2011) para ilustrar o caso clínico nº 1. ....	57

Figura 15 - Gil no internamento do HVR, durante o exame físico da manhã (fotografia de Catarina Cerqueira). .....	68
Figura 16 - Observação de características externas, pelo, condição corporal e estado mental, do Gil durante o internamento (fotografia de Catarina Cerqueira). .....	69
Figura 17 - Resultados da eletroforese de proteínas. ....	77
Figura 18 – Resultado da eletroforese de proteínas no soro. ....	81
Figura 19 - Olho direito do D. Dinis onde podemos observar uveíte e formas amastigotas (fotografia gentilmente cedida por Dr. Diogo Magno) .....	85
Figura 20 - Amastigotas de <i>Leishmania</i> no interior de macrófagos em corte histológico do OD do D. Dinis, nas regiões do corpo ciliar (A), coróide (B) e retina (C) (fotografias gentilmente cedidas por Laboratórios Idexx, Madrid). .....	88
Figura 21 - Imagem histológica que evidencia a rutura do cristalino no OD do D. Dinis (fotografia gentilmente cedida por Laboratórios Idexx, Madrid). ....	89
Figura 22 - Resultado de eletroforese de proteínas séricas com proteinograma. ....	124
Figura 23 - Sistema de Triadan modificado de gato (adaptado de Norsworthy <i>et al.</i> , 2011). 138	
Figura 24 - Resultados do proteinograma do D. Dinis realizado a 31 de maio de 2017.....	138
Tabela 1 - Espécies de <i>Leishmania</i> spp. descritas em cães do Novo e Velho Mundos (adaptado de Dantas-Torres, 2012). .....	7
Tabela 2 - Anomalias observadas na avaliação histopatológica. ....	34
Tabela 3 - Estadiamento clínico para a LCan baseado na serologia e manifestações clinicopatológicas (adaptado de Sollano-Galego, 2011).....	44
Tabela 4 - Protocolos de tratamento mais utilizados para leishmaniose em cães e gatos (adaptado de: Hervás <i>et al.</i> , 1999; Sollano-Galego <i>et al.</i> , 2011; Pennisi <i>et al.</i> , 2015, 2015; DGAV, 2015; Pimenta <i>et al.</i> , 2015).....	51
Tabela 5 - Resultados da pesquisa de hemoparasitas por IFI.....	59
Tabela 6 - Resultado do exame dermatológico. ....	64
Tabela 7 - Resultado das bioquímicas no soro. ....	65
Tabela 8 - Relatório de ecocardiografia .....	66
Tabela 9 - Resultados da análise bioquímica. ....	70
Tabela 10 - Resultados do exame oftalmológico. ....	74
Tabela 11 - Resultado do Leiscan® (ELISA). ....	75
Tabela 12 - Resultado do PCR conjuntival. ....	75

Tabela 13 – Resultados da citologia conjuntival do Happy. ....	75
Tabela 14 - Resultados do rácio UP/C. ....	80
Tabela 15 - Resultados registados ao exame oftalmológico do D.Dinis.....	84
Tabela 16 - Resultados do hemograma pré-cirúrgico. ....	86
Tabela 17 - Resultados da análise bioquímica pré-cirúrgica.....	86
Tabela 18 - Resultados registados na exploração da cavidade intra-oral do D. Dinis. ....	87
Tabela 19 - Resultado da avaliação histológica do OD do D. Dinis.....	89
Tabela 20 - Resultados do ELISA para <i>Leishmania</i> . ....	90
Tabela 21 - Resultados de IFI .....	91
Tabela 22 - Variações de peso do Black Jack durante os 2 meses referentes ao diagnóstico e instauração de plano terapêutico .....	121
Tabela 23 - Apresentação dos resultados obtidos em alguns hemogramas realizados entre o mês de Setembro e Outubro no HVR. ....	121
Tabela 24 - Resultados das análises bioquímicas séricas do Black Jack, realizadas no HVR. .....	122
Tabela 25 - Análises de urina com UP/C realizadas no HVR.....	122
Tabela 26 - Resultados dos ionogramas obtidos por análise laboratorial no HVR.....	122
Tabela 27 - Resultados de ecografia abdominal.....	123
Tabela 28 - Resultado de rácio UP/C.....	123
Tabela 29 - Resultados da análise bioquímica. ....	125
Tabela 30 - Hemograma, sem alterações relevantes. ....	125
Tabela 31 - Resultados do ionograma. ....	126
Tabela 32 - Resultado do tempo de ativação parcial de tromboplastina. ....	126
Tabela 33 – Resultados do exame de urina tipo II. ....	126
Tabela 34 - Resultados do hemograma. ....	127
Tabela 35 - Resultados de análises realizadas anteriormente em outro CAMV. ....	127
Tabela 36 - Resultados da análise bioquímica. ....	128
Tabela 37 - Resultados do ionograma sérico. ....	128
Tabela 38 - Resultados de ecografias abdominais ao longo do processo terapêutico.....	129
Tabela 39 - Resultados da análise de urina tipo II. ....	132
Tabela 40 - Resultados do esfregaço de sangue para pesquisa de hemoparasitas.....	132
Tabela 41 - Resultados dos hemogramas do Happy. ....	133
Tabela 42 - Resultados das bioquímicas do Happy.....	133

Tabela 43 - Rácio UP/C do Happy.....	134
Tabela 44 - Resultados da análise de urina tipo II. ....	134
Tabela 45 - Resultados da ecografia abdominal.....	135
Tabela 46 - Resultados do hemograma. ....	136
Tabela 47 Resultados das análises bioquímicas do soro. ....	136
Tabela 48 - Resultados de microbiologia, urocultura e antibiograma.....	137
Tabela 49 - Rácio UP/C do D. Dinis a 30 de maio de 2017.....	138

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

% – percentagem

® – símbolo de marca registada

A/G – albumina/globulinas

Ac - anticorpos

ADN – ácido desoxirribonucleico

AE – átrio esquerdo

AINE – anti-inflamatório não esteróide

ALP – fosfatase alcalina

ALT – atividade da alanina transferase

AO – artéria aorta

APTT – tempo de tromboplastina parcial ativada

BAS – basófilos

BEecf – excesso de base de fluído extracelular

BID – duas vezes ao dia

BUN – azoto ureico no sangue

CAMV – centro de atendimento médico-veterinário

CBC – hemograma

CD – grupamento de diferenciação

CIC – imunocomplexos circulantes

CID – coagulação intravascular disseminada

CMI – imunidade mediada por células

CVBD – doenças transmitidas por vetores em animais de companhia

DAT – teste de aglutinação direta

DRC – doença renal crónica

DTH – hipersensibilidade retardada

ECG – eletrocardiograma

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

EOS - eosinófilos

ESP – proteínas de excreção/secreção de proteínas

FDP – degradação de produtos de fibrina

FeLV – vírus da leucemia felina

FIV – vírus da imunodeficiência felina  
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa  
FOXP – proteínas forkhead box  
Glu – glucose  
GPT – transaminase glutâmica-pirúvica  
H&E – hematoxicilina e eosina  
HCO<sub>3</sub> – bicarbonato  
Hct - hematócrito  
HD – hospedeiro definitivo  
HGB – hemoglobina  
HI – hospedeiro intermediário  
HPCO – higienização profissional da cavidade oral  
HVR – Hospital Veterinário do Restelo  
iCa – iões de cálcio  
IECA – inibidor da enzima de conversão da angiotensina  
IFI – imunofluorescência indireta  
IFN – interferão  
Ig – imunoglobulinas  
IHQ – imunohistoquímica  
IL – interleucina  
IM – via intramuscular  
IR – insuficiência renal  
IRA – insuficiência renal aguda  
IRC – insuficiência renal crónica  
IRIS – Sociedade Internacional de Interesse Renal  
IV – via endovenosa  
K – potássio  
LC – leishmaniose cutânea  
LCan – leishmaniose canina  
LES – lúpus eritematoso sistémico  
LFel – leishmaniose felina  
LV – leishmaniose visceral  
LYM - linfócitos

MAD – membro anterior direito  
MCH – hemoglobina corpuscular média  
MCHC – concentração de hemoglobina corpuscular média  
MCV – volume corpuscular médio  
MON – zimodemes  
MPV – volume plaquetário médio  
Na – sódio  
NEU – neutrófilos  
°C – símbolo de grau Celsius, unidade de temperatura  
OD – olho direito  
OIE – Organização Mundial para a Saúde Animal  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
OS – olho esquerdo  
PAS – ácido periódico – Schiff  
pCO<sub>2</sub> – pressão parcial de gás carbónico  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
PCT – procalcitonina  
PDW – largura de distribuição plaquetária  
PIO – pressão intraocular  
PLT – contagem plaquetária  
PO – via oral ou “per os”  
pO<sub>2</sub> – pressão parcial de oxigénio  
PT – tempo de protrombina  
PU/PD – poliúria/polidípsia  
QCS – queratoconjuntivite seca  
qPCR – PCR em tempo real ou quantitativa  
RBC - eritrócitos  
RDW – largura da distribuição das células vermelhas  
RDW-CV – coeficiente de variação da largura da distribuição das células vermelhas  
RDW-SD – desvio padrão da largura da distribuição das células vermelhas  
REFLP – polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição  
RPMI – Instituto Memorial Roswell Park  
RT-PCR – transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase

SC – via subcutânea  
SFM – sistema fagocitário mononuclear  
SID – uma vez ao dia  
SNC – sistema nervoso central  
SO<sub>2</sub> – dióxido de enxofre  
TCO<sub>2</sub> – toneladas de dióxido de carbono  
Th – T helper  
TID – três vezes ao dia  
TNF – fator de necrose tumoral  
TT – tempo de trombina  
™ - símbolo de marca comercial  
UI – unidade internacional  
UP/C – proteína-creatinina urinária  
VE – ventrículo esquerdo  
VIH – vírus da imunodeficiência humana  
WB – imunodeteção ou “western blot”  
WBC - leucócitos

## Introdução

A leishmaniose é uma doença com grande potencial zoonótico, que tem como reservatório primário o cão. Além de casos clínicos descritos em seres humanos, também se podem verificar casos de infecção e doença em gatos e até cavalos (Beugnet *et al.*, 2018).

A infecção é originada pela invasão de parasitas protozoários do género *Leishmania* no sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros mamíferos. O parasita é transmitido primariamente pelas atividades hematófagas das fêmeas de insetos flebotomíneos, que podem pertencer ao género *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou ao género *Lutzomyia* (Novo Mundo). Como a leishmaniose pertence ao grupo das metazooses, para o ciclo da *Leishmania* estar completo é necessária a intervenção de um hospedeiro vertebrado (cão, gato, ser humano ou outro) e um hospedeiro invertebrado (inseto) (Mencke, 2013). Esta doença é prevalente em pelo menos 98 países, três territórios e cinco continentes, com maior prevalência nos países subdesenvolvidos (Ribeiro *et al.*, 2018).

A leishmaniose canina (LCan) pode causar a morte dos cães que constituem um importante reservatório de infecção para os seres humanos (Gramiccia e Gradoni, 2005). Uma vez que os cães infetados podem manter-se portadores (subclínicos) por longos períodos, é possível encontrar-se LCan em países não endémicos, devendo sempre evitar-se o movimento de cães infetados de países endémicos para indêmnos (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Os gatos eram considerados hospedeiros acidentais da doença, mas, atualmente sabemos que podem desempenhar o papel epidemiológico de hospedeiros secundários. Embora sejam detetados cada vez mais casos de leishmaniose felina (LFel), os gatos podem ficar infetados subclínicamente por vários meses, contribuindo potencialmente para a transmissão de *Leishmania* aos flebotomos (Mattos *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008).

Os parasitas conseguem através de vários mecanismos, evitar o sistema imunitário e estabelecer a infecção (Koutinas e Koutinas, 2014).

Nos últimos anos, a incidência de leishmaniose, em humanos, cães ou gatos, parece ter aumentado (Simões-Mattos *et al.*, 2005; Gramiccia, 2011).

Como o período de incubação da LCan é lento, a serologia é geralmente positiva quando surgem os primeiros sinais clínicos. A LCan é polimórfica clinicamente, com lesões cutâneas e sistémicas. A presença de qualquer sinal deve levantar suspeita, especialmente em zonas endémicas, podendo estes variar e ser mais ou menos pronunciados conforme a progressão da

doença (Beugnet *et al.*, 2018). Qualquer tecido ou órgão pode estar envolvido na infecção por *Leishmania infantum*, em que as lesões cutâneas são os sinais clínicos mais sugestivos da doença e a insuficiência renal a mais importante no prognóstico (Pennisi *et al.*, 2013).

Em gatos é mais frequente surgirem apenas lesões cutâneas do que nos cães (Grevot *et al.*, 2005; Rüfenacht *et al.*, 2005; Pennisi *et al.*, 2015), apesar de alguns gatos apresentarem sinais cutâneos e sistêmicos simultaneamente (Pennisi *et al.*, 2015).

Em seres humanos a infecção pode ter manifestações clínicas diferentes das dos cães e gatos, e se não tratada pode ser fatal (Gramiccia, 2011). A leishmaniose humana acomete com maior frequência crianças e adultos imunodeprimidos (Cardoso *et al.*, 2010). O elevado impacto desta zoonose nos seres humanos levou que fosse considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) como uma das doenças tropicais mais negligenciadas do globo (Gramiccia, 2011).

Para se diagnosticar a leishmaniose em cães e gatos recorre-se à avaliação clínica e/ou laboratorial, de forma direta e indireta (Pennisi *et al.*, 2015), de modo organizado e sequencial (Gramiccia, 2011; Albuquerque *et al.*, 2017). No que concerne ao diagnóstico clínico, este deve basear-se em vários diagnósticos diferenciais, na epidemiologia e dados clínicos (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Beugnet *et al.*, 2018).

Os protocolos terapêuticos para cães e gatos baseiam-se em alopurinol, antimoniato de meglumina e miltefosina (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Pennisi *et al.*, 2015). A seleção dos fármacos e plano de tratamento deve ter presente as diferentes formas clínicas da doença (Oliva *et al.*, 2010), com vista a resolver sinais clínicos e limitar a progressão da doença (Noli e Saridomichelakis, 2014). O tratamento providencia geralmente recuperação clínica, mas pode não eliminar por completo o parasita, sendo possível o aparecimento de recorrências.

Uma vez que pode não existir cura parasitológica e/ou clínica, deve-se promover a profilaxia, medidas contra a picada de insetos, sobretudo através de produtos disponíveis no mercado (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Por este motivo, a leishmaniose zoonótica constitui situação preocupante para a saúde pública, principalmente pela relação de proximidade dos seres humanos com cães e/ou gatos (Beugnet *et al.*, 2018).

Esta dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária tem por base o estágio curricular realizado no Hospital Veterinário do Restelo (HVR), em Lisboa, entre setembro e dezembro de 2017 (inclusive). Durante o estágio estive em regime de rotação nas várias especialidades oferecidas para animais de companhia e espécies exóticas, tais como: medicina interna, cardiologia, cirurgia, ortopedia, internamento, dermatologia e oftalmologia.

O motivo que me leva ao encontro do tema desta dissertação é a crescente preocupação com esta zoonose, tão difícil de controlar e com considerável risco para a saúde pública. Foi empolgante para mim todo o processo clínico, desde o desafiante diagnóstico, ao tratamento e monitorização da doença. Todo esse processo permitiu-me consolidar os meus conhecimentos e selecionar seis casos clínicos que aprofundo nesta dissertação.



# 1. REVISÃO DA LITERATURA CIENTÍFICA

## 1.1. Etiologia

A leishmaniose é uma zoonose endêmica na bacia do Mediterrâneo, incluindo Portugal, com apresentações clínicas diversas e cujos agentes etiológicos são transmitidos a animais domésticos e, animais selvagens e a seres humanos através de flebotomíneos hematófagos - *Phlebotomus* spp. do Velho Mundo e *Lutzomyia* spp. do Novo Mundo (WHO, 2017).

A leishmaniose é uma doença da lista da Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE, ano 2018) e uma das mais importantes doenças transmitidas por vetores (Kaszak *et al.*, 2015). Causada por protozoários intracelulares obrigatórios – *Leishmania infantum* no Mediterrâneo (e sinónimo: *Leishmania chagasi* na América Latina). O nome deriva de William Boog Leishman, patologista e diretor geral dos serviços médicos do exército britânico entre 1923 e 1926 (CVBD, 2017). *Leishmania infantum* pertence ao reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kitenoplasta, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae (Taylor *et al.*, 2016). Estes protozoários são digenéticos e heteroxenos, com fase promastigota no vetor e amastigota nos macrófagos do hospedeiro (Martínez-Moreno *et al.*, 1999). O género *Leishmania* divide-se em subgéneros conforme o local de desenvolvimento do protozoário no interior do vetor:

(1) subgénero *Leishmania*: o crescimento destas é restrito a zonas do trato gastrointestinal anteriores ao piloro;

(2) subgénero *Viannia*: é restrito ao intestino médio dos flebotomíneos.

As espécies do subgénero *Leishmania* estão descritas conforme as suas características clínicas, epidemiológicas e biológicas, agrupando-se algumas destas em espécies do Velho Mundo (*L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. major*, *L. infantum* e *L. donovani*) e do Novo Mundo (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* e *L. pifanoi*). As espécies mais importantes do subgénero Vianna são *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana*, que infetam seres humanos na América do Sul e Central (CVBD, 2017).

A diferenciação no subgénero *Leishmania* baseia-se principalmente na comparação das sequências de ADN, nos padrões de migração das isoenzimas (zimodemes) por electroforese, na reatividade aos anticorpos monoclonais e antigénios na membrana celular (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Os cães são os reservatórios primários de *Leishmania infantum*, subgénero mais importante pela sua transmissão aos seres humanos, e os mais afetados pelo parasita. A

consciencialização desta possibilidade tem elevada importância clínica e diagnóstica por induzir efeitos patológicos mais severos que infeções com um só agente (CVBD, 2017). Nos países da bacia mediterrânica foram identificados entre 1981 e 2010, 12 zimodemes de *L. Infantum* (MON-1, MON-24, MON-34, MON-72, MON-77, MON-80, MON-98, MON-105, MON-108, MON-199, MON-199 var NP1130 e MON-281), com predominância de MON-1 em cães (Aït-Oudhia *et al.*, 2011).

Os gatos, raposas (*Vulpes vulpes*), roedores e equinos podem estar naturalmente infetados ou serologicamente positivos, no entanto, é improvável que atuem como hospedeiros primários (CVBD, 2017). Estão identificadas cinco espécies do género *Leishmania* em gatos: *Leishmania mexicana*, *Leishmania venezuelensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* no Novo Mundo, e *Leishmania infantum* em ambos, Novo e Velho Mundos (Pennisi *et al.*, 2015).

## 1.2. Epidemiologia

Estão descritas aproximadamente duas dezenas de espécies patogénicas de *Leishmania* em seres humanos e cerca de 30 espécies de insetos flebotomíneos como vetores biológicos (Dantas-Torres, 2007). Foram encontradas pelo menos 12 espécies de *Leishmania* em cães afetados, destacando-se de *L. infantum* também responsável pelas leishmanioses visceral (LV) e cutânea (LC) em humanos. *L. infantum* com elevada prevalência (Figuras 1 e 2) na Europa, Médio-Oriente e Extremo-Oriente, África, Centro e Sul da América e toda a região mediterrânea. Alterações ecológicas e na distribuição dos vetores *Lutzomyia* justificam a doença emergente no sul do Brasil e norte da Argentina (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

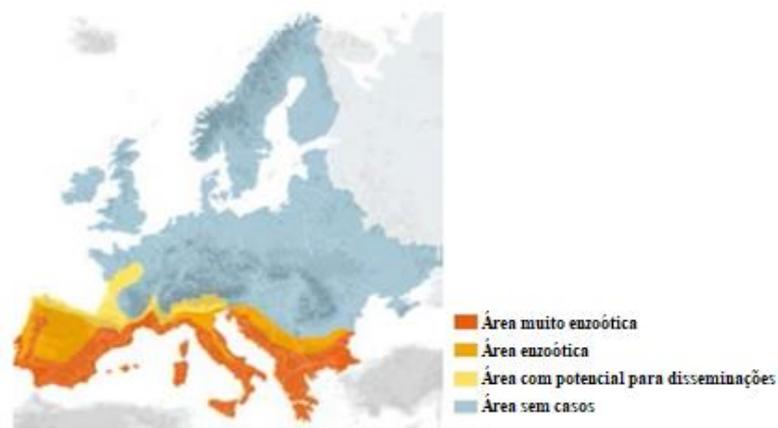


Figura 1 - Distribuição de LCan provocada por *Phlebotomus* spp. no continente Europeu (adaptada de Beugnet *et al.*, 2018).

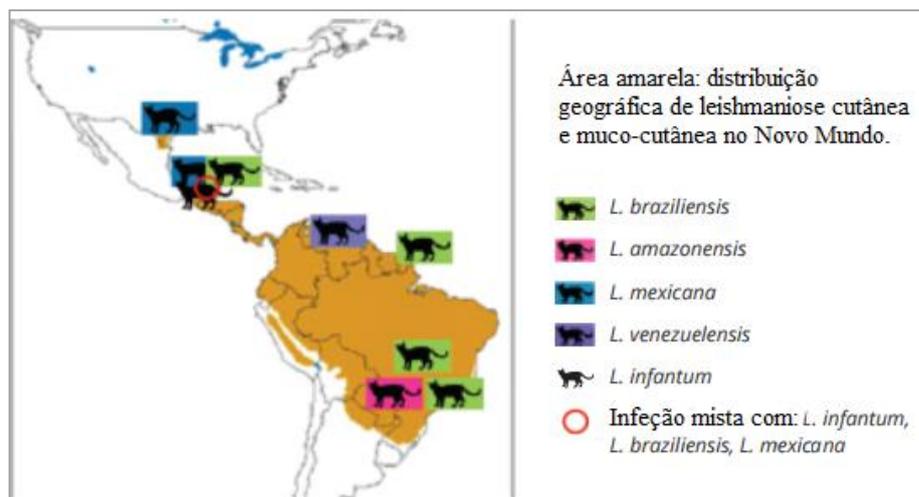


Figura 2 - Distribuição geográfica de LFel no Novo Mundo (adaptada de [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en)).

Tabela 1 - Espécies de *Leishmania* spp. descritas em cães do Novo e Velho Mundos (adaptado de Dantas-Torres *et al.*, 2012).

<b><i>Leishmania</i> spp.</b>	<b>Vetores</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>L. amazonensis</i>	<i>L. flaviscutellata</i> , <i>L. nociva</i> , <i>L. whitmani</i>	Brasil
<i>L. arábica</i>	<i>P. papatasi</i>	Arábia Saudita
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. intermedia</i> , <i>L. migonei</i> , <i>L.</i> <i>wellcomei</i> , <i>L. whitmani</i> e <i>outros</i>	América do Sul
<i>L. colombiense</i>	<i>L. hartmanni</i>	Venezuela
<i>L. guyanense</i>	<i>L. anduzei</i> , <i>L. umbratilis</i> , <i>L.</i> <i>whitmani</i>	Colômbia
<i>L. infantum</i>	<i>L. longipalpis</i> , <i>L. evansi</i> , <i>P.</i> <i>neglectus</i> , <i>P. perniciosus</i> e <i>outros</i>	África, América, Ásia, Europa
<i>L. major</i>	<i>P. papatasi</i>	Egipto, Arábia Saudita
<i>L. mexicana</i>	<i>L. ayacuchensis</i> , <i>L. olmeca</i>	Equador, EUA
<i>L. panamense</i>	<i>L. hartmanni</i> , <i>L. gomezi</i> , <i>L.</i> <i>panamensis</i> , <i>L. trapidol</i> , <i>L.</i> <i>sanguinária</i>	Colômbia, Equador, Panamá
<i>L. peruviana</i>	<i>L. peruensis</i> , <i>L. verrucarum</i>	Perú
<i>L. pifanoi</i>	<i>L. flaviscutellata</i> , <i>L. youngi</i>	Equador
<i>L. tropica</i>	<i>P. sergenti</i>	Índia, Irão, Marrocos, Síria

\*"L" é referente a *Lutzomyia* e "P". é referente a *Phlebotomus*  
 \*Baseado apenas nos casos clínicos publicados acerca de LCan, podendo a distribuição atual de *Leishmania* spp. e seus respectivos vetores ser superior nos animais de companhia.

A LCan é considerada endêmica em mais de 70 países e estima-se que existam cerca de 2,5 milhões de cães infetados na Itália, França, Espanha e Portugal (Moreno e Alvar, 2002). Na Europa, a LCan foi considerada durante anos como estando restrita à região mediterrânea, mas

atualmente é uma doença com presença também em alguns países da Europa do Norte (Ferroglio *et al.*, 2005; Kaszak *et al.*, 2015). A crescente procura turística e transações de animais por estes países poderão estar na génese do problema (Kaszak *et al.*, 2015).

Verifica-se uma rápida e difusa propagação da doença nas populações de cães quando em condições ambientais ótimas à sua transmissão (Baneth *et al.*, 2008). A idade pode ser um bom indicador da infeção, uma vez que Amela *et al.* (1995) alegam que a prevalência aumenta até aos cães atingirem os 3 anos, diminuindo em seguida até aos 7-8 anos de idade. Embora a suscetibilidade à doença esteja relacionada com a atividade do animal e no geral todas as raças sejam suscetíveis, existem cães como o podengo de Ibiza e os rafeiros com uma maior resistência. Os cães selvagens, rurais ou de trabalho estão mais expostos aos mosquitos hematófagos comparativamente aos que vivem nas cidades (Moreno e Alvar, 2002).

Em áreas endémicas são frequentes infeções em canídeos e felídeos. Nos últimos anos foram descritos por todo o Mundo vários casos de leishmaniose felina (LFel) com formas cutâneas e viscerais (Simoes-Mattos *et al.*, 2005). A prevalência de infeção por *Leishmania infantum* em populações de gatos é normalmente estimada pela deteção de anticorpos específicos e amplificação de ADN por técnica de PCR, sendo menor que nos cães dada a sua frequência (Pennisi *et al.*, 2013; Cardoso *et al.* 2010). A partir de uma revisão de estudos publicados, verifica-se uma elevada variabilidade de prevalências de anticorpos ou de prevalências moleculares, que podem ser explicadas pelos diferentes níveis de endemecidade, características das populações estudadas ou métodos diagnósticos diferentes, incluindo os títulos limiares de positividade (“cut-offs”). Estas disparidades de prevalência podem ser explicadas pela aparente maior resistência felina e resposta imunitária mais eficaz contra o desenvolvimento da doença em gatos fetados (Pennisi *et al.*, 2015).

Contrariamente à ideia de que os gatos não desempenhavam qualquer papel na epidemiologia de *L. infantum* nas zonas endémicas, atualmente sabe-se que a sua intervenção não deve ser ignorada (Maia e Campino, 2011). Apesar de os gatos aparentemente controlarem melhor a infeção e raramente manifestarem leishmaniose, a doença felina está muitas vezes associada a imunossupressões provocadas por FIV ou FeLV. Além disso, a população de gatos de rua ou em colónias urbanas pode ser maior do que a dos cães em regiões endémicas, facilitando estas transmissões (Pennisi *et al.*, 2013). Perante o descrito, assume-se que os gatos são um reservatório secundário de *Leishmania infantum* não tendo a mesma importância quantitativa que os cães, uma vez que o perfil epidemiológico dos felinos ainda está por quantificar (Maia e Campino, 2011).

### 1.3. O parasita e o vetor biológico

*Leishmania* spp. podem surgir sob as formas amastigota ou promastigota. Nos hospedeiros vertebrados o parasita é encontrado na sua forma amastigota intracelular nos macrófagos e células fagocitárias, que se produzem poucas horas após penetrarem no hospedeiro. Em colorações com Wright ou Giemsa (Figura 3) aparecem como corpos ovóides ou redondos, com 2,5 a 5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5 a 2  $\mu\text{m}$  de largura, pequeno núcleo central muito basófilo e um cinetoplasto em forma de haste (Baneth e Solano-Gallego, 2012; Rakich e Latimer, 2011; Martínez-Moreno *et al.*, 1999).

As formas promastigotas (Figura 4) são flageladas e móveis, com um corpo de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  provido de flagelo. Possuem uma extremidade anterior cônica e uma extremidade posterior redonda, com núcleo central e cinetoplasto na extremidade anterior, próximo do flagelo. São encontrados no trato digestivo do vetor biológico (flebótomo) na sua forma infetante, *i.e.* as formas prometacíclicas, mais pequenas, ativas e com um flagelo muito comprido (Martínez-Moreno *et al.*, 1999).

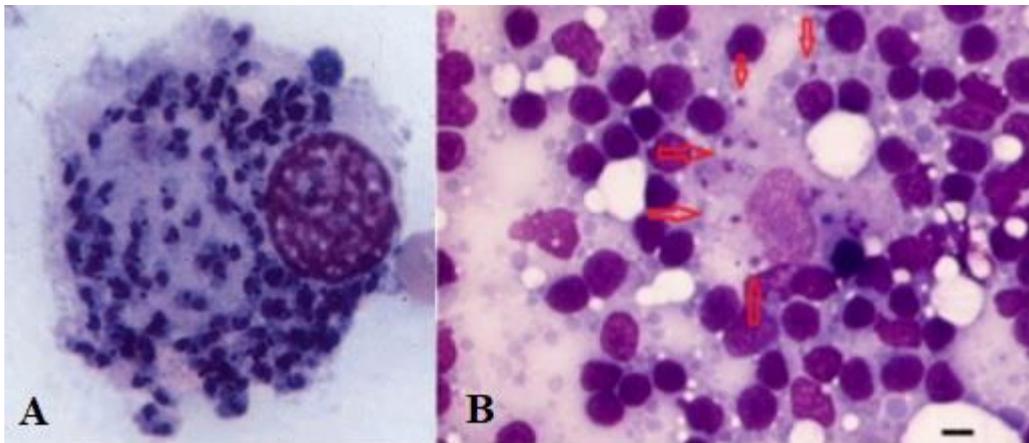


Figura 3 - Formas amastigotas de *Leishmania infantum* no interior de macrófagos de cão (A) e gato (B), obtidas através de aspirado de linfonodos reativos (coloração de May-Grünwald-Giemsa) (adaptado de Baneth e Solano-Gallego, 2012; Pennisi *et al.*, 2015).

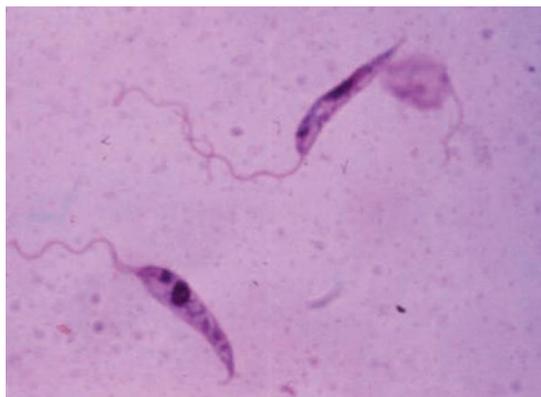


Figura 4 - Promastigotas de *Leishmania*, com núcleo redondo e o cinetopasto (coloração May-Grunwald-Giemsa, x1000) (adaptado de Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Os vetores do género *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo são pequenos insetos com comprimento médio de 3 mm e atividade crepuscular e noturna consoante a localização e sazonalidade. Na região do Mediterrâneo e na Ásia verifica-se maior atividade nos meses quentes, desde a primavera até ao fim do Outono, enquanto algumas espécies da América Latina estão ativas durante todo o ano (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Os cães e os gatos podem ser expostos simultaneamente a mais do que um vetor artrópode, nomeadamente as carraças, infetados com uma única ou mais espécies de agentes, ocorrendo coinfeções (CVBD, 2017). Uma outra hipótese sobre os artrópodes, *Rhipicephalus sanguineus*, estudados como potenciais vetores da *Leishmania infantum* surgiu no século XX e tem sido atualmente testada recorrendo às técnicas modernas de biologia molecular (Dantas-Torres, 2011).

#### 1.4. Ciclo de vida

Os parasitas do género *Leishmania* precisam de dois hospedeiros para completar o ciclo de vida (Figura 5): um inseto vetor (definitivo) e um hospedeiro mamífero (intermediário). Apenas os insetos fêmea são hematófagos e dão início ao ciclo biológico (Martínez-Moreno *et al.*, 1999; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Quando os flebotomos, hospedeiros definitivos, picam a pele de um animal infetado para fazerem uma refeição de sangue, ingerem as formas amastigotas no interior de macrófagos da pele (Gradoni *et al.*, 2002; Beugnet *et al.*, 2018). No flebotomo, as formas amastigotas são libertadas dos macrófagos onde são transformados numa célula extracelular flagelada – a forma promastigota procíclica. Depois de sucessivas replicações forma-se a promastigota metacíclica

não infetante que se liberta do epitélio do intestino de flebótomo e migra para o intestino anterior e para a faringe do mesmo (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Quando o flebótomo, agora infetado, volta a outro hospedeiro intermediário para fazer nova refeição, deposita, por regurgitação, as formas promastigota metacíclicas (adaptadas para sobreviver no vertebrado), na pele do novo hospedeiro, preferencialmente em zonas de pêlo rarefeito como a cabeça, focinho, pavilhões auriculares, áreas inguinais e perianais (Gradoni *et al.*, 2002; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Estes promastigotas vão ser fagocitados por macrófagos, perdendo aí o flagelo e voltando novamente à forma amastigota (Gradoni *et al.*, 2002). As formas amastigotas no interior dos macrófagos dividem-se por multiplicação binária levando à rotura das células e multiplicando-se em novos macrófagos dentro do organismo do animal, nomeadamente nos linfonodos, baço, medula óssea e fígado, estabelecendo assim a infeção sistémica (Baneth e Solano-Gallego, 2012; Duque *et al.*, 2014; Beugnet *et al.*, 2018). Portanto, o ciclo biológico completa-se quando um flebótomo se infeta e se alimenta num novo hospedeiro intermediário, cão ou gato, suscetível (Weese *et al.*, 2011; Beugnet *et al.*, 2018).

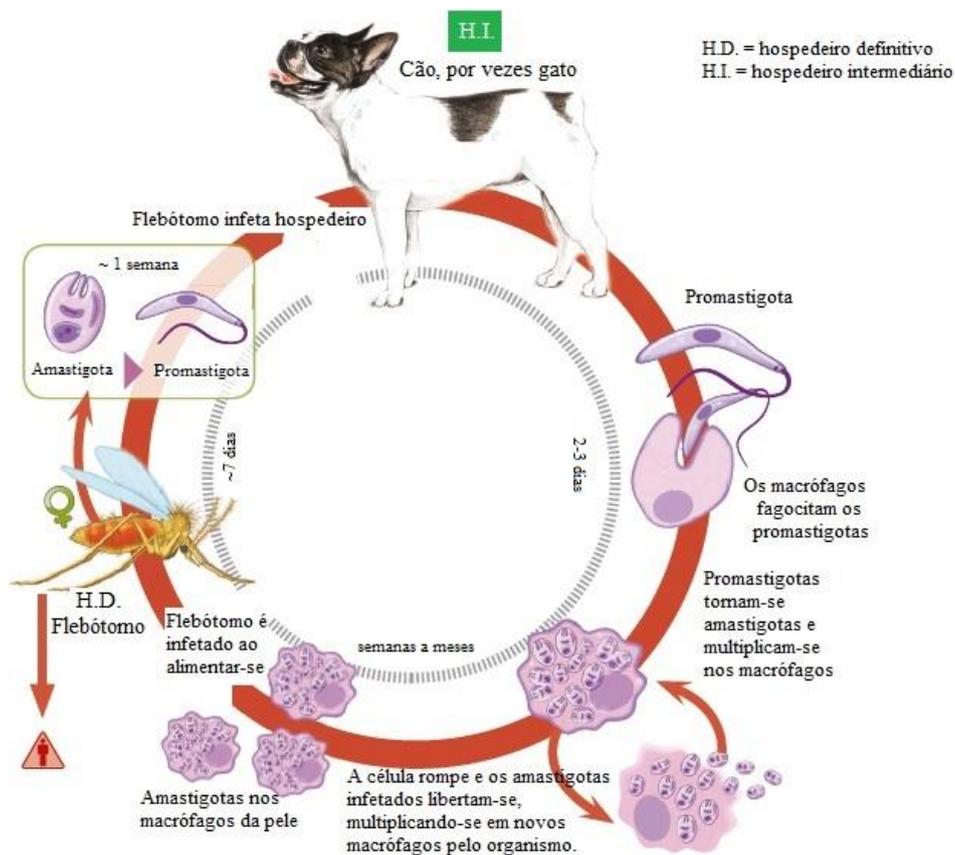


Figura 5 - Ciclo de vida de *Leishmania* (adaptado de Beugnet *et al.*, 2018).

A capacidade de diferentes espécies de insetos atuarem como vetores está relacionada com a capacidade das promastigotas para se fixarem especificamente a ligandos no intestino dos flebotomíneos. Quando estas ligações não ocorrem, os parasitas que inicialmente se replicaram no lúmen intestinal são excretados nas fezes dos insetos e perdem a capacidade para infectar um hospedeiro durante uma segunda ingestão de sangue (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

## 1.5. Transmissão

Os protozoários *Leishmania* spp. apresentam elevado risco de transmissão pelo seu longo período de incubação, persistência subclínica e grande viabilidade após colheitas de sangue. Os flebotomíneos vetores são os principais responsáveis pela transmissão de *Leishmania infantum* mas existem outras formas de transmissão (Figura 6):

- (1) Transfusões de sangue ou derivados provenientes de doadores infetados. Uma vez que os cães doadores podem ser portadores (subclínicos) da infecção, é aconselhável testar todos os potenciais doadores de sangue em áreas endêmicas de *Leishmania* spp. e vacinar os doadores permanentes para garantir transfusões provenientes de animais seronegativos (Owens *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2006). Demonstrado em 2006 por Freitas *et al.*, apesar de ocorrerem frequentemente nos cães, as transfusões sanguíneas adquirem também importância na leishmaniose felina, devendo estas medidas ser igualmente aplicadas a gatos.
- (2) Vertical ou transplacentária: descrita em seres humanos e cães. Uma vez que o fornecimento de sangue da placenta se encontra próximo da circulação materna há elevada probabilidade dos parasitas entrarem na circulação fetal (Rosypal *et al.*, 2005). Um estudo levado a cabo no Paraguai, descreve a relação entre o parasitismo por *Leishmania* e a distribuição de amastigotas em órgãos fetais com alterações histopatológicas, sendo possível determinar a frequência de transmissão entre cadelas gestantes doentes e infetadas mas aparentemente saudáveis. A distribuição de amastigotas é idêntica em órgãos fetais ou de adultos, mas os cachorros nascidos de cadelas infetadas devem ser considerados potencialmente afetados e fonte de infecção. Assume-se então que a reprodução das cadelas e gatas infetadas deve ser desaconselhada de modo a prevenir transmissões verticais e dispersão da doença (Pangrazzio *et al.*, 2009). Caso as fêmeas prossigam para reprodução, e tal como

sugerido por Figueiró-Filho *et al.* (2004), deve-se aconselhar o tratamento das cadelas previamente à monta, de forma a reduzir a carga parasitária (Silva *et al.*, 2009).

- (3) Transmissão venérea: estudos revelam que as lesões inflamatórias nos genitais e o parasita, *Leishmania* spp. (complexo *donovani*), no sémen dos cães estão associados a leishmaniose, o que sugere a possibilidade de transmissão venérea da infecção (Diniz *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2009, Sollano-Gallego *et al.*, 2011).

Suspeita-se ainda que a leishmaniose canina se transmita por contacto direto através de mordidas ou feridas, explicando os casos de LCan em raças autóctones nas regiões não endémicas da Europa do Norte com aparente ausência de flebotómicos vetores (Shaw *et al.*, 2009), e por artrópodes hematófagos como carraças e pulgas (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Diversos autores discutem a possibilidade de *L. infantum* ser transmitida por ixodídeos ou pulgas pela sua capacidade de obter sangue do hospedeiro vertebrado, pela duração da alimentação, e pela frequência de troca de hospedeiro (Coutinho e Linardi, 2007). Como referido por Coutinho *et al.* (2005), sugere-nos que, embora não comprovada, haverá a possibilidade de que a transmissão oral de *Leishmania chagasi* possa ocorrer através de ixodídeos *Rhipicephalus sanguineus*. Em 2007, Maroli *et al.*, demonstrou que existe a possibilidade de gatos adquirirem leishmaniose através de hospedeiros menos usuais como *Phlebotomus perniciosus*.

Considerando as formas de transmissão previamente descritas, os riscos de transmissão para os tutores dos animais de companhia são relativamente baixos (Sollano-Gallego *et al.*, 2011).

Estima-se que em áreas onde a *Leishmania infantum* é endémica na população canina, a probabilidade de os gatos contactarem com o parasita e serem infetados é bastante elevada. Os flebotómicos parecem menos específicos na sua preferência de fontes de sangue do que se pensava anteriormente (Pennisi *et al.* 2015).



Figura 6 - Modos de transmissão não vetoriais de *Leishmania infantum* em cães (adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011).

## 1.6. Fisiopatogenia

A relação parasita-hospedeiro influencia a patogenia da leishmaniose, em que uma série de fatores inerentes aos mesmos irá influenciar o tipo de resposta imunitária desencadeada, podendo ocorrer uma variedade de manifestações imunológicas e clínicas, que vão desde a infecção subclínica até à presença de quadros clínicos graves (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A resposta imunitária do hospedeiro vertebrado no momento da infecção determina a evolução da doença e manifestação dos sinais clínicos (Baneth e Solano-Gallego, 2012), o que pode resultar em:

- (1) Infecção auto-limitante: os parasitas são eliminados diretamente no local de ação;
- (2) Infecção sem expressão clínica: os parasitas são sequestrados na pele ou nos órgãos linfóides, o que impede a sua disseminação;
- (3) Infecção disseminada: os parasitas disseminam-se para os diferentes órgãos do hospedeiro vertebrado podendo levar ao aparecimento de alterações patológicas (Moreno e Alvar, 2002; Alvar *et al.*, 2004; Baneth *et al.*, 2008; Saridomichelakis, 2009).

O resultado da infecção pode depender de vários fatores: do vetor (repetidas picadas e injeção da saliva na pele do hospedeiro), da virulência do parasita e da resistência do hospedeiro (genética, resposta imunitária, doenças concomitantes e estado nutricional) (Saridomichelakis, 2009). A suscetibilidade pode estar relacionada com a genética ou ser adquirida, em animais com idade avançada ou doenças concorrentes, embora não se conheçam totalmente os mecanismos associados a esta e à resistência à doença apesar de alguns autores referirem o determinante papel genético do hospedeiro (Pinelli *et al.*, 1994; Moreno e Alvar, 2002; Baneth *et al.*, 2008; Saridomichelakis, 2009).

A multiplicação parasitária em cães suscetíveis conduz a uma inflamação granulomatosa associada a mecanismos imunomediados, uma vez que até numa situação de imunossupressão um cão resistente se pode tornar sensível (Moreno e Alvar, 2002; Alvar *et al.*, 2004; Baneth *et al.*, 2008; Saridomichelakis, 2009).

Animais infetados experimental ou naturalmente desenvolvem uma resposta imunitária celular e humoral, enquanto a ausência dessa resposta permite a progressão da doença (Moreno e Alvar, 2002). Na presença de imunidade mediada por células ou imunidade celular (CMI) a infecção é controlada e o animal mantém-se subclínicamente infetado (Pinelli, *et al.*, 1994). Numa área endémica, devido à resistência natural, apenas 1/3 dos cães expostos a *Leishmania* desenvolvem infecção ativa (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Solano-Gallego *et al.* (2000) relataram que existem determinadas raças de cães com uma aparente maior resistência a *L. infantum* em zonas endémicas, comparativamente a outras, devido à sua imunidade celular duradoura, como é o caso do Pastor de Ibiza (Solano-Gallego *et al.*, 2000).

A resistência associada à raça caracteriza-se normalmente por uma baixa e por vezes indetetável produção de anticorpos e resposta celular eficaz, e é orquestrada por citocinas como a Interleucina-2 (IL-2), interferão-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Saridomichelakis, 2009). Agentes imunossupressores como o vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus da leucemia felina (FeLV) ou o stresse podem induzir uma disfunção imunológica com resposta celular enfraquecida, permitindo a multiplicação ativa do parasita e a sua disseminação a nível visceral (Hervás *et al.*, 1999).

A primeira linha de defesa do organismo é a resposta imunitária inata/inespecífica que se inicia quando o flebótomo inocula as promastigotas metacíclicas – forma infetante – juntamente com a saliva na pele do hospedeiro, constituindo esta a etapa de parasitismo intracelular dos macrófagos (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Após essa primeira interação ocorre uma reação inflamatória localizada na pele do animal que vai atrair outras células, como neutrófilos,

histiocitos, macrófagos e monócitos. Os macrófagos e monócitos são responsáveis por transformar as formas promastigotas em amastigotas através da fagocitose, multiplicando-se estas últimas no interior dos fagolisossomas (Saridomichelakis, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Ocorre a ruptura dos macrófagos e as formas amastigotas lá existentes vão infectar novas células e disseminar-se desta forma por todo o organismo do hospedeiro vertebrado, provocando diversas alterações crônicas. A infecção atinge principalmente os órgãos hemolinfáticos (linfonodos, baço, medula óssea e fígado) e zonas cutâneas distintas e remotas, até estabelecer uma infecção sistêmica (Pangrazio *et al.*, 2009; Saridomichelakis, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012). A doença multiorgânica está relacionada com a sobreprodução específica e sobretudo não específica de anticorpos face à multiplicação parasitária (Saridomichelakis, 2009).

Os macrófagos produzem óxido nítrico, principal mediador de morte intracelular das formas amastigotas através de morte celular apoptótica controlada por inibidores proteicos, desempenhando um papel muito importante nas infecções por *Leishmania* (Holzmuller *et al.*, 2006; Baneth *et al.*, 2008). No decorrer da doença, verifica-se também uma alteração na população de linfócitos e restantes células da linha branca. Uma forma mais grave da doença, associada a um elevado parasitismo vem quase sempre acompanhada pela diminuição de células T (CD4+, CD5+, CD8+), linfócitos B CD21+ e monócitos. Porém, quando o parasitismo é reduzido e a infecção é subclínica observa-se o aumento de CD8+ (Reis *et al.*, 2006, 2009; Guerra *et al.*, 2009).

Enquanto a infecção primária se estabelece na pele e consequentes órgãos linfóides, as leishmânias produzem inúmeros efeitos a nível dos macrófagos e células dendríticas (Peters e Sacks, 2006). *Leishmania infantum* aparenta induzir uma resposta imunitária celular mista entre linfócitos Th1 e Th2, quer em cães com infecção subclínica, quer em cães doentes (Baneth *et al.*, 2008).

À medida que a infecção evolui para doença clínica, aumenta a produção de interleucinas pelo fenótipo Th-2 (IL-4, IL-6 e IL-10) (Pumarola *et al.*, 1991; Pinelli *et al.*, 1994; Ciaramella e Corona, 2003). Há um estímulo da imunidade humoral e uma depressão da imunidade celular, uma vez que os linfócitos B produzem anticorpos não protetores, sendo um sinal de falha no controlo da infecção (Baneth *et al.*, 2008). As regiões dos linfócitos B começam a proliferar enquanto as regiões dos linfócitos T nos órgãos linfóides tornam-se raros. Alguns sinais clínicos frequentes da doença, como a adenomegalia generalizada, esplenomegalia e hiperglobulinemia são provocados pela proliferação dos linfócitos B, plasmócitos, histiócitos e macrófagos. O

excesso de imunoglobulinas (Ig) produzido causa uma hipergamoglobulinemia crônica, sem ação protetora podendo vir a revelar-se prejudicial (Lucena e Ginel, 1998; Smith *et al.*, 2004). Consequente a este fenômeno, ocorre a formação de diversos imunocomplexos circulantes (CIC), combinações de anticorpos, antígenos e frações com complemento (Lopez *et al.*, 1996), que se podem depositar na parede dos vasos sanguíneos, causando vasculite, poliartrite, uveíte e glomerulonefrite. Quando os CIC se depositam nos rins pode ocorrer insuficiência renal (IR), sinal característico da LCan. Estes podem também induzir vasculite, necrose dos tecidos, lesões na derme, viscerais, oculares e por vezes no sistema nervoso (Pumarola *et al.*, 1991; Font *et al.*, 2004; Torrent *et al.*, 2005). A IgG é a imunoglobulina predominante em detrimento das IgM, IgE e IgA. Uma vez que em animais com infecção subclínica a concentração de IgG é menor que em animais doentes esta estará relacionada com a gravidade clínica associada a carga parasitária nos tecidos (Saridomichelakis, 2009). Cardoso *et al.* (2007) sugeriram que as subclasses 1 e 2 de IgG sejam utilizadas como marcadores fidedignos do estado clínico da LCan em comparação com a IgG total.

Baneth *et al.* (2008) descrevem como determinadas citocinas produzidas pelas células Th1; nomeadamente IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ ; induzem a atividade dos macrófagos contra as leishmânias (Baneth *et al.*, 2008).

As células dendríticas vão impedir a resposta imunitária inata e a capacidade de resposta das células T auxiliares. A pele é um local favorável à sobrevivência do parasita pelas células T reguladoras (CD25+ e FOXP3), cuja função é suprimir respostas imunitárias desnecessárias a antígenos, a que a pele é regularmente exposta. Foi observado que em murganhos, face à indução antigénica de algumas células T reguladoras (CD25+, Foxp3 e interleucina 10+) houve uma boa resposta imunitária à doença. Após se verificar a resolução da infecção nestes roedores, assume-se que a função das células T reguladoras na IL-10 induz uma cura estéril e uma boa resposta imunitária a longo prazo (Peters e Sacks, 2006).

Cardoso *et al.* (2007) observaram que na LCan a suscetibilidade está associada a altos níveis de anticorpos específicos e alterações nas respostas por parte das células T, assim como a ausência de hipersensibilidade retardada (DTH) face a antígenos de *Leishmania* spp. Tem sido sugerido que a associação de células auxiliares (Th2 e CD4+) com as citocinas IL-4 e IL-10 esteja relacionada com a doença em cães. Apesar disso, CD4+ e os subconjuntos das células Th1 produzem IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF $\alpha$  que estão envolvidos na resistência à leishmaniose, uma vez que é predominante em cães subclínicamente infetados. As células T citotóxicas, CD8+, também parecem ter envolvimento no processo de resistência a LCan, estando diretamente

envolvidas na lise dos macrófagos infetados por *L. infantum* em cães assintomáticos (Barbiéri, 2006; Peters e Sacks, 2006).

## **1.7. Sinais clínicos**

A leishmaniose pode comprometer qualquer órgão ou tecido, devido aos diversos processos patogénicos da doença e, aos diferentes órgãos e tecidos afetados. Há inúmeras respostas imunitárias do hospedeiro vertebrado, que explicam as variadas manifestações clínicas da doença e uma extensa lista de diagnósticos diferenciais que muitas vezes se confundem com outras doenças (Ciaramella *et al.*, 1997; Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

### **a) Cães**

O período de incubação da doença é bastante variável podendo ir de 3 meses a 1 ano após infeção, pelo que encontramos animais infetados que regressaram de zonas endémicas há vários meses ou até anos. Como esta incubação pode ser longa, a serologia é geralmente positiva aquando do surgimento dos primeiros sinais clínicos (Beugnet *et al.*, 2018). Um estudo levado a cabo no Reino Unido, com 257 cães infetados provenientes de várias regiões da Europa, sugere que cerca de 96% destes viveram pelo menos 6 meses em regiões endémicas (Shaw *et al.*, 2009). Nas regiões onde a prevalência molecular da infeção é de cerca de 60%, apenas 10 a 30% dos cães apresentaram sinais clínicos (Sollano-Gallego *et al.*, 2011).

A LCan é uma doença clinicamente polimórfica com sinais clínicos inespecíficos, sendo mais frequentes as alterações dermatológicas, dos linfonodos e renais (Beugnet *et al.*, 2018; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2015).

### **b) Gatos**

Os gatos devido à sua boa resposta celular contra a LFel apresentam uma resistência natural à doença. A maioria dos sinais clínicos, com doença ativa, são encontrados em felinos com o sistema imunitário deprimido, seja por infeções, terapêutica com imunossuppressores, stresse ou outras doenças concomitantes (Spada *et al.*, 2013; Pennisi *et al.*, 2015). Em gatos é mais frequente surgirem apenas sinais dermatológicos do que nos cães (Grevot *et al.*, 2005; Rufenacht *et al.*, 2005; Pennisi *et al.*, 2015), mas alguns gatos apresentam sinais dermatológicos

e sistêmicos (Pennisi *et al.*, 2015), para além de linfadenomegalia, esplenomegalia, perda de peso, atrofia muscular, intolerância ao exercício, perda de apetite, letargia, poliúria e polidípsia, lesões oculares, epistaxis, vômitos e diarreia (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Baneth *et al.*, 2008; Pennisi *et al.*, 2015). Em zonas endémicas o aparecimento de qualquer um dos sinais, mais ou menos evidentes, é razão para se suspeitar de leishmaniose (Beugnet *et al.*, 2018).

### 1.7.1. Sinais clínicos gerais

Na leishmaniose as alterações comportamentais são bastante evidentes com o decurso da doença, como a perda de apetite com acentuada apatia e depressão. Na LCan com envolvimento visceral (Baneth e Solano-Gallego, 2012), como consequência da redução do apetite, é frequente surgirem perdas de peso corporal acompanhada de amiotrofia que em cães origina aspeto de um animal triste e velho. A perda de massa muscular tem início na região temporal e músculos mandibulares, com afundamento das fossas temporais e mais tarde nos membros e ancas, que ficam mais proeminentes (Beugnet *et al.*, 2018). A polimiosite crónica nos músculos da mastigação e nos restantes músculos esqueléticos é responsável pela progressiva e grave perda de massa muscular (Vamvakidis *et al.*, 2000; Troxel, 2009). Associada a essa atrofia estão fenómenos como a deposição de imunocomplexos nas articulações e glomérulos renais, deposição de anticorpos séricos antimiofibrilas e vasculite neutrofílica (Vamvakidis *et al.*, 2000; Baneth *et al.*, 2008; Beugnet *et al.*, 2018). Segundo Blavier *et al.* (2001), assume-se que histologicamente existam várias lesões inflamatórias e degenerativas no tecido muscular, com infiltrados mononucleares associados a formas amastigotas de *Leishmania* spp. Macroscopicamente, observa-se no interior das porções normais do músculo áreas tumefactas, de cor branco-acinzentada e com consistência macia (Blavier *et al.*, 2001).

A perda de peso nem sempre estará associada à anorexia, uma vez que um cão afetado pode perder condição corporal apesar do seu apetite voraz, dada a competição a nível nutricional que ocorre entre o parasita e o hospedeiro, o que conduz a alterações na absorção intestinal e danos renais (Saridomichelakis, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

A hipertermia na LCan é usualmente inconstante e apenas se verifica em animais jovens com menos de 2 anos de idade (Beugnet *et al.*, 2018). No entanto, em animais infetados de todas as idades, podem ser observadas alterações analíticas hematológicas e bioquímicas, sob

a forma de anemia, leucopenia e trombocitopenia, as mais frequentes (Beugnet *et al.*, 2018). Nos cães e gatos, o aumento de globulinas resulta numa reversão do rácio albuminas/globulinas (de 1 para 0.3 – 0.1), enquanto a leucopenia é geralmente acompanhada por monocitose e hiperptoteinemia (Beugnet *et al.*, 2018).



Figura 7 - Baixa condição corporal e aspeto de “cabeça de velha” em Boxer diagnosticado com LCan (fotografia de Catarina Cerqueira).

### 1.7.2. Alterações dermatológicas

As alterações cutâneas raramente são pruriginosas, podendo variar nas suas características e na extensão da lesão (Baneth e Solano-Gallego, 2012). São as manifestações mais frequentes da LCan com elevada prevalência (56-90%) (Slappendel, 1988; Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999).

Das várias dermatites descritas na LCan podemos enfatizar:

- (1) Dermatite esfoliativa não pruriginosa, generalizada ou localizada, com ou sem alopecia, nomeadamente na área circundante dos olhos, focinho, orelhas, cauda e membros;
- (2) Dermatite ulcerativa nas proeminências ósseas, junções mucocutâneas, almofadinhas plantares e pavilhões auriculares;
- (3) Dermatite nodular focal ou multifocal;
- (4) Dermatite proliferativa mucocutânea;
- (5) Dermatite papular (Ordeix *et al.*, 2005; Bottero *et al.*, 2006; Beugnet *et al.*, 2018).

A multiplicação das leishmânias na matriz da extremidade dos membros provoca muitas vezes o crescimento excessivo de unha, onicogribose, estimulado pela presença de macrófagos infectados na matriz inguinal e inflamação crónica existente. No que respeita a alterações queratogénicas, observam-se sinais de descamação significativa com várias formas e dimensões, que se renovam a cada escovagem. Supõe-se que a hiperqueratose esteja relacionada com a descamação à medida que a epiderme perde espessura e sofre hiperpigmentação – melanose – tornando a pele pregueada e grisalha, geralmente na zona do nariz e ouvidos, disseminando-se mais tarde (Beugnet *et al.*, 2018).

Os danos ulcerativos na mucosa surgem como úlceras, salientes e com tendência em propagarem-se num fluxo de fluido seroso rico em leishmânias. Estas lesões localizam-se na maioria das vezes no interior dos ouvidos, no nariz, almofadas plantares (associado a dor intensa e claudicação reflexa), mucosa nasal (provoca hemorragias nasais e epistaxis, sinal frequente de LCan em áreas endémicas), mucosa oral e digestiva, podendo curar-se temporariamente se na forma seca. A proliferação das linhas de macrófagos na derme pode provocar nódulos subcutâneos com diâmetro de alguns centímetros. Estes nódulos são palpáveis e indolores e parecem afetar apenas determinadas raças como os Boxer (Beugnet *et al.*, 2018).

A despigmentação, paniculites, hiperqueratose nasal e digital, erupção pustular, alopecia areata ou pênfigo foliáceo, e eritema multiforme constituem as manifestações cutâneas mais atípicas nos animais infectados (Blavier *et al.*, 2001; Papadogiannakis *et al.*, 2005), contrariamente ao pioderma por estafilococos, superficial ou profundo, que é relativamente mais frequente (Solano-Gallego *et al.*, 2009).



Figura 8 - Cadela com LCan que apresenta sinais de anorexia, perda de peso, apatia e evidentes lesões dermatológicas não pruriginosas nos membros e região ventral (fotografia de Catarina Cerqueira).

É possível observar-se no exame dermatológico, a presença de nódulos não ulcerados de variados diâmetros (entre 1 a 10 cm), semelhante ao granuloma macrofágico anérgico encontrado na leishmaniose cutânea em seres humanos (Ciaramella e Corona, 2003). Histologicamente, as lesões cutâneas são caracterizadas pela formação de granulomas inflamatórios centrados nos histiocitos parasitados (granulomas linfomonocíticos) (Beugnet *et al.*, 2018).

Simões-Mattos *et al.* (2005) testaram a sensibilidade dos gatos domésticos a uma infecção experimental por *L. braziliensis* cujas primeiras lesões a foram a nível dermatológico. Na orelha, começou por surgir uma pápula única, seguida por inúmeras pápulas secundárias em redor da lesão primária, que coalesceram e formaram um nódulo grande e irregular. Consequentemente, ocorreu disseminação da lesão na região marginal e externa da orelha ipsilateral e mais tarde na orelha contralateral. Determinou-se que 25% dos gatos envolvidos na experiência desenvolveu mais tarde nódulos e úlceras com rápida evolução. Grande parte destes sofreu infiltração na mucosa levando à obstrução parcial das narinas, enquanto que apenas um apresentou sinais de alopecia nos pavilhões auriculares (Simoes- Mattos *et al.*, 2005).

### 1.7.3. Linfadenomegalia e esplenomegalia

Em cães e gatos com leishmaniose, a linfadenomegalia ou hipertrofia dos linfonodos é bastante característica, assim como a sua facilidade na palpação ao exame físico dos linfonodos superficiais, pré-escapulares e poplíteos (Ciaramella e Corona, 2003; Simões-Mattos *et al.*, 2005). Os linfonodos cervicais são os mais fáceis de avaliar ao exame pela sua localização junto às orelhas e focinho (Lima *et al.*, 2004). Esta alteração pode ocorrer, também, nos linfonodos mesentéricos, mediastínicos e periféricos (Petersen, 2009).

Esta poliadenopatia pode ser confundida com linfoma uma vez que os linfonodos podem atingir até 2 a 6 vezes o seu tamanho normal, não é dolorosa e pode ser diagnosticada a partir de punção (Simões-Mattos *et al.*, 2005; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Os danos causados no sistema fagocitário mononuclear (SFM) estendem-se a vários órgãos (baço, fígado e linfonodos) constituídos por monócitos e macrófagos parasitados (Beugnet *et al.*, 2018). Este fenómeno tem início com alterações vasculares, hiperemia, e hiperplasia das células reticulares dos seios medulares, com grande quantidade de hemossiderina no citoplasma das células. Os cordões medulares estão geralmente reduzidos e são constituídos por linfócitos e células plasmáticas. Pela desorganização cortical dos folículos linfóides pode ocorrer simultaneamente hiperplasia, hipoplasia e desaparecimento de folículos, aparecendo, então, populações de células plasmáticas, linfócitos e células reticulares distribuídas irregularmente (Martínez-Moreno *et al.*, 1999).

A esplenomegalia é um sinal frequente em humanos com leishmaniose visceral, mas é um sinal clínico raro em animais de companhia, podendo surgir apenas num estágio avançado da doença, acompanhados por bastante dor (Beugnet *et al.*, 2018). É uma inflamação hiperplásica com depleção linfocitária (Martínez-Moreno *et al.*, 1999) e estima-se que apenas cerca de 54% dos cães com leishmaniose manifestem esta condição (Ciaramella e Corona, 2003).

### 1.7.4. Alterações renais

A doença renal pode ser a única manifestação clínica de LCan e pode progredir de uma proteinúria razoável para síndrome nefrótica ou para um estágio final de IR. A insuficiência renal crónica (IRC) pode surgir inicialmente por poliúria e polidipsia, um resultado grave da progressão da doença e a principal causa de morte por LCan. Apesar da elevada prevalência de doença renal em animais infetados, a azotemia renal não é muito frequente nos dados

laboratoriais. Por essa razão, é essencial avaliar a função renal e realizar o estadiamento de acordo com as recomendações da “International Renal Interest Society” (IRIS) (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Alguns autores defendem que em 100% dos animais com LCan se observam lesões histológicas renais (Costa *et al.*, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2009). A doença renal associada à leishmaniose pode afetar os glomérulos, túbulos e tecido intersticial. No início é o sistema tubular que sofre alterações, tubulonefrose, com degenerescência das células da parede, tumefação turva, degeneração vacuolar, perda de microvilosidades e eventuais processos de necrose isolados. As lesões glomerulares aparecem mais tarde, manifestando-se sob a forma de glomerulonefrite membranoproliferativa com espessamento da membrana basal dos glomérulos, depósito de substância hialina e proliferação de células endoteliais e mesangiais (Martínez-Moreno *et al.*, 1999). A abundância de complexos imunitários pode também explicar o desenvolvimento da IRC por glomerulonefrite (Plevraki *et al.*, 2006; Beugnet *et al.*, 2018). No entanto, a nefrite intersticial difusa é caracterizada por edema e abundante infiltrado celular (Martínez-Moreno *et al.*, 1999). Para além destas lesões, estão descritos casos de edema periférico, ascites, proteinúria e hipertensão associada à doença renal (Ciaramella e Corona, 2003; Saridomichelakis, 2009).

#### **1.7.5. Distúrbios hemostáticos**

As alterações hemorrágicas mais frequentes são a epistaxis (ou epistaxe), seguida da hematuria e melena associados a lesões inflamatórias e ulcerativas da mucosa, podendo também ser associadas a uma elevada hipergamaglobulinemia (Blavier *et al.*, 2001; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Habitualmente surgem em ambiente clínico cães e gatos com epistaxis, unilateral e intermitente como resultado da alteração dos fatores envolvidos na hemóstase primária e secundária. (Ciaramella e Corona, 2003). Muitas vezes este é o único sinal clínico podendo ser menosprezado e levar à morte do animal por hemorragia (Baneth *et al.*, 2008).

A presença do parasita no fígado poderá causar lesões que levam secundariamente à modificação dos tempos de coagulação (APTT, PT e TT). Em 1999, Martínez-Moreno *et al* determinou que a elevação do tempo de ativação parcial da tromboplastina (APTT) pode estar relacionada com a atividade da alanina transferase (ALT) (Blavier *et al.*, 2001). Estas desordens na coagulação podem agravar a progressão da doença e piorarem o prognóstico, uma vez que

pode causar choque, insuficiência renal aguda (IRA), síndrome nefrótico e danos vasculares graves (Pumarolla *et al.*, 1991; Blavier *et al.*, 2001).



Figura 9 - Podengo português com LCan e mucosas pálidas, sinal clínico de anemia (fotografia de Catarina Cerqueira).

Estas complicações são o resultado de vários distúrbios que ocorrem nos fatores envolvidos na hemostase primária e secundária, como vasculite mediada por imunocomplexos, disfunção plaquetária, trombocitopenia, diminuição do fator de coagulação, fibrinólise, trombocitopenia, hiperviscosidade sérica induzida por hiperglobulinemia e rinite linfoplasmocítica ou granulomatosa com ou sem ulceração nasal (Blavier *et al.*, 2001; Juttner *et al.*, 2001; Ciaramella e Corona, 2003; Ciaramella *et al.*, 2005; Baneth *et al.*, 2008).

As alterações a nível hematológico, seja pela alteração na síntese e metabolismo dos fatores de coagulação ou função plaquetária, estão associadas a estádios avançados da doença com processos inflamatórios instalados, imunossupressão e lesões renais e hepáticas (Ciaramella *et al.*, 2005).

Valladares *et al.* (1998) descreveram uma complicação rara em LCan causada de modo experimental, concretamente coagulação intravascular disseminada (CID), associada a trombocitopenia, trombopatias, elevação dos tempos de trombina (TT) e degradação de produtos de fibrina (FDP) e modificação do APTT (Blavier *et al.*, 2001).

#### **1.7.6. Alterações locomotoras**

Os sinais osteoarticulares são raros, apesar de se verificar uma locomoção anormal em grande parte dos cães com LCan (Blavier *et al.*, 2001). O envolvimento musculoesquelético e

a poliartrite não são frequentes, uma vez que poliartrite resultado de uma reação de hipersensibilidade do tipo III com depósito de imunocomplexos nas articulações, embora se possam identificar leishmânias no líquido sinovial ou nos macrófagos da membrana sinovial (Blavier *et al.*, 2001; Pugliese *et al.*, 2006). Usualmente a poliartrite é não erosiva e pode estar ou não associada a sinovite com aumento de temperatura local, edema, dor e por vezes miotrofia (Blavier *et al.*, 2001).

Quando as leishmânias são encontradas nos ossos e articulações de cães infetados, provocam lesões simétricas e bilaterais responsáveis pela claudicação intermitente observável (Pugliese *et al.*, 2006), e podem ser isoladas em processos de aspiração de líquido sinovial e de medula óssea (Ciaramella e Corona, 2003). Nestas situações é frequente encontrar-se nas radiografias reações do periósteo, aumento da radiopacidade intramedular, lesões no córtex e medula das diáfises de ossos longos, rótula e pélvis, assim como lesões articulares osteolíticas e proliferativas (Blavier *et al.*, 2001; Pugliese *et al.*, 2006). Todos estes distúrbios locomotores e lesões articulares podem ser atribuídos a processos inflamatórios e degenerativos (Blavier *et al.*, 2001).

### **1.7.7. Lesões oculares**

Nos cães e gatos com leishmaniose estão descritas lesões oculares como queratite azul, conjuntivite, blefarite (esfoliativa, ulcerativa ou nodular), uveíte anterior, corioretinite, queratoconjuntivite (comum ou seca) (Baneth e Solano-Gallego, 2012; Beugnet *et al.*, 2018)

Os cães afetados exibem usualmente uma variedade de lesões oculares (16-80,5%), que podem ser unilaterais ou bilaterais e localizadas frequentemente no segmento ótico anterior (Pugliese *et al.*, 2006; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Após o tratamento é frequente observarem-se granulomas corneais com *Leishmania*, junto às junções muco-cutâneas, que estão associados ou não a histiócitos (Pugliese *et al.*, 2006). Supõe-se que o protozoário circulante na corrente sanguínea chega à córnea através de novas vascularizações provocando inflamações granulomatosas e até mesmo nódulos granulomatosos, únicos e salientes na superfície da íris (Pugliese *et al.*, 1990, 2006).

Histologicamente, pela presença de amastigotas na conjuntiva, limbo ou corpo ciliar, ocorre uma inflamação linfoplasmocitária e granulomatosa em padrão nodular, perivascular ou difuso (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Na queratoconjuntivite seca, o infiltrado inflamatório em torno dos ductos lacrimais provoca a retenção da produção e secreção lacrimal, enquanto a

formação de sinequias posteriores pode conduzir à obstrução pupilar e aumento da pressão intraocular (glaucoma) (Ciaramella e Corona, 2003; Baneth *et al.*, 2008).

Apesar da tortuosidade arterial da retina e hifema serem raros, estes distúrbios a nível ocular em cães com LCan e hipertensão arterial sistémica têm graves consequências como o descolamento e/ou hemorragias da retina (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Estima-se que cerca de um terço da população de gatos infetados com LFel apresente lesões oculares. Os sinais clínicos mais descritos em gatos são a uveíte seguida de blefarite e conjuntivite. A uveíte pode ser unilateral ou bilateral, tem ocasionalmente um padrão granulomatoso pseudotumoral e eventual progressão para panofalmitite (Pennisi *et al.*, 2015).

Em situações de blefarite e conjuntivite podemos encontrar formas amastigotas de *Leishmania* por citologia de nódulo conjuntival, infiltrados corneais, humor aquoso e após histopatologia do olho enucleado. As lesões oculares em gatos com leishmaniose levam na maioria das vezes a perda de visão e enucleação (Pennisi *et al.*, 2015).

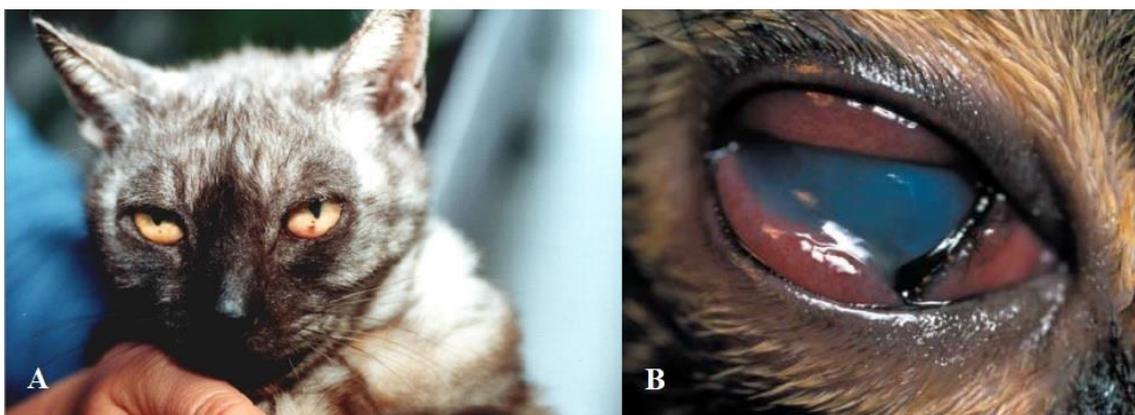


Figura 10 - Uveíte bilateral com hifema na câmara anterior (A); e descarga de mucosa, equimose e edema difuso do endotélio corneal (B) em gatos com LFel (adaptado de Leiva *et al.*, 2005; Pennisi *et al.*, 2015).

### 1.7.8. Lesões neurológicas

Embora com baixa frequência, estão descritas alterações nos nervos motores e sensoriais associadas a infeção por *Leishmania* spp (Beugnet *et al.*, 2018). Os problemas de locomoção em cachorros, na fase aguda de leishmaniose, estão relacionados com distúrbios no sistema nervoso central (SNC) como meningites (Pugliese *et al.*, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Os parasitas podem ser encontrados dentro ou fora de macrófagos no SNC, causando reações

tecidulares, lesões dos nervos e degenerescência neural. A presença de anticorpos e imunoglobulinas no espaço intersticial, perivasculares e intravasculares dos plexos coróides estão associados a mobilização de células da glia, lesões inflamatórias subependimárias e depósitos amiloides intravasais nos capilares sinusais (Blavier *et al.*, 2001; Pugliese *et al.*, 2006).

Como referido anteriormente, o edema dos membros e a ataxia poderá ser provocada pela hiperviscosidade do sangue associada a hiperproteinemia e hipergamaglobulinemia (Denerolle, 1996; Pugliese *et al.*, 2006). Font *et al.* (2004) relataram o caso de uma cadela sénior, com LCan e a receber tratamento adequado, que desenvolveu um quadro de paraplegia aguda secundário à doença. Num estágio avançado da doença, com IR e sinais do neurónio motor inferior, a cadela foi eutanasiada dada a progressão da doença e a ausência de qualidade de vida. Histopatologicamente, deparou-se com um quadro de vasculite leucocitoclástica disseminada, rutura e trombose de vasos inflamados que provocaram malácia e hemorragia da medula espinal com consequente paralisia (Font *et al.*, 2004).

#### **1.7.9. Lesões orais**

As lesões orais não são muito frequentes, mas podem surgir sob formas raras ou atípicas da doença (Parpaglia *et al.*, 2007). Na mucosa lingual de cães com LCan foram descritas lesões nodulares únicas e/ou múltiplas, salientes e com tamanho variável, associadas por vezes a úlceras (Blavier *et al.*, 2001; Parpaglia *et al.*, 2007). Os tutores relatam dificuldades na mastigação e preensão de alimentos, observando-se posteriormente ao exame detalhado halitose, gengivite, glossite ulcerativa, vermelhidão e presença de estruturas nodulares (Figura 11), que poderão ser posteriormente puncionados para pesquisa de formas amastigotas dentro de macrófagos (Lamothe e Poujade., 2002; Viegas *et al.*, 2012).



Figura 11 - Lesões nodulares na superfície dorsal da língua de cão com LCan (adaptado de Viegas *et al.*, 2012).

#### 1.7.10. Alterações gastrointestinais

Estão documentados casos de LCan com sintomatologias digestivas associadas à presença de parasitas *L. infantum* causando colite crónica, melena, inflamação granulomatosa da mucosa do colón e até mesmo enterite hemorrágica aguda fatal (Blavier *et al.*, 2001; Pugliese *et al.*, 2006).

#### 1.7.11. Outros sinais

Cães jovens podem, embora raramente, apresentar efusões pleurais e abdominais com amastigotas no interior de células fagocitárias comprometendo o sistema imunitário do hospedeiro (Blavier *et al.*, 2001; Pugliese *et al.*, 2006).

Lesões nos órgãos genitais também podem surgir como sinal clínico desta doença, através de granulomas localizado no ápex ou corpo peniano dos cães, com petéquias e equimoses na mucosa e submucosa do pénis. Nas fêmeas, estão descritas granulomas e pequenos nódulos submucosos por toda a vulva e vestíbulo vaginal, por vezes associados a aborto entre o 40º e 50º dias de gestação. Segundo Gimbo *et al.* (1994), isolaram-se parasitas de *Leishmania* através de lesões vulvares, fluídos uterinos e zonas de implantação placentária. Estas descobertas de parasitas nos órgãos sexuais sugerem transmissão por via transplacentária e sexual, descritas anteriormente (Pugliese *et al.*, 2006).

Lesões no sistema cardiovascular surgem ocasionalmente, embora a sua frequência seja baixa. Para além das efusões pleurais associadas ao parasita, observaram-se também granulomas nos ventrículos cardíacos (Blavier *et al.*, 2001).

## 1.8. Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose em cães e gatos pode ser realizada por método clínico e/ou laboratorial, de forma direta e indireta (Pennisi *et al.*, 2015; Beugnet *et al.*, 2018). Os principais motivos pela qual se pesquisa a infecção por *Leishmania* nos cães são: confirmar se um cão com alterações laboratoriais compatíveis com LCan está infetado; investigar a presença da infecção em estudos epidemiológicos, através do rastreio de cães aparentemente saudáveis que vivem em regiões endêmicas; evitar transfusões sanguíneas provenientes de cães subclínicos; evitar o movimento de cães infetados para países indemnes; e monitorizar as respostas ao tratamento para a LCan (Miró *et al.*, 2008; Sollano-Galego *et al.*, 2009).

A abordagem geral para diagnosticar a doença nos cães deve ser organizada e ter uma sequência de procedimentos, podendo ser também adaptada a gatos e cavalos (Gramiccia, 2011; Albuquerque *et al.*, 2017). O diagnóstico clínico parte de vários diagnósticos diferenciais e baseia-se na epidemiologia e considerações clínicas (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Beugnet *et al.*, 2018). No diagnóstico laboratorial baseamo-nos nos resultados laboratoriais e de análises parasitológicas, moleculares e imunológicas (Gramiccia, 2011).

Os procedimentos podem ser agrupados em métodos diretos, que detetam o parasita e em métodos indiretos, que avaliam o sistema imunitário e a resposta do hospedeiro ao parasita (Gramiccia, 2011; Beugnet *et al.*, 2018).

É importante um historial clínico completo, com exame físico e vários exames complementares, como a análise hematológica, o perfil bioquímico, a análise de urina e a eletroforese sérica, para confirmar a suspeita clínica da doença. Rotineiramente, devem ser realizados perfis de coagulação, radiografias, ecografia abdominal, avaliação citológica e histológica de tecidos e fluídos. Desenvolveram-se técnicas de elevada sensibilidade e especificidade para detetar, entender e interpretar a infecção de leishmaniose em cães doentes, embora não existam testes 100% sensíveis e específicos (Solano-Gallego, 2009).

### 1.8.1. Métodos Diretos

#### a) Avaliação laboratorial

Os testes laboratoriais básicos incluem o hemograma (“complete blood count” - CBC), análises bioquímicas séricas, eletroforese de proteínas plasmáticas e análises de urina, podendo

ainda realizar-se provas de coagulação (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011). Estes são parâmetros essenciais para entender a origem da doença e interpretá-la conforme o resultado de um teste específico de diagnóstico (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A LCan está frequentemente associada a anemia não regenerativa, que pode ser moderada a grave, normocítica e normocrômica (Koutinas *et al.*, 1999; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Esta é frequente, consequência de uma falha na eritropoiese, em casos de doença crônica, por IRC, deficiência em ferro, displasia eritroide, epistaxe e outras infecções concomitantes (Saridomichelakis, 2009; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Embora a linfopenia seja frequente em animais com LCan, a leucocitose moderada, a leucopenia e a pancitopenia são tidas como inconstantes (Petanides *et al.*, 2008). Vários autores sugerem outras alterações hemostáticas associada à doença. Na prática, hiperviscosidade plasmática, trombocitopenia, trombocitopenia imuno-mediada secundária, hemostase secundária debilitada e fibrinólise podem ser, também, encontradas (Ciaramella *et al.*, 2005; Terrazzano *et al.*, 2006; Petanides *et al.*, 2008; Cortese *et al.*, 2009 a, b).

Na bioquímica sérica observa-se hiperproteinemia com hiperglobulinemia policlonal  $\beta$  e  $\gamma$ . Existe hipoalbuminemia associada à perda de proteínas por doença hepática, nefropatia, malnutrição ou a combinação de ambos, resultantes do decréscimo do rácio albumina/globulina (Koutinas *et al.*, 1999; Baneth e Solano-Gallego, 2012), enquanto as proteínas da fase aguda (proteína C reativa, amiloide A e haptoglobina) se encontram aumentadas (Baneth e Solano-Gallego, 2012). São frequentes sinais de afeção hepática, estrutural e funcional, assim como um aumento moderado das enzimas ALT e ALP (fosfatase alcanina), e também hipercolesterolemia (Palacio *et al.*, 1995; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Pode ocorrer um aumento moderado da bilirrubina total e pós-pandrial dos ácidos biliares associada à lesão hepática. Nos animais com um quadro clínico compatível com IRC observa-se um rácio proteína/creatinina urinária (UP/C)  $\geq 0.5$  ou uma azotemia renal com valores aumentados de creatinina sérica, ureia nitrogenada sérica (BUN) e fosfato sérico (Koutinas *et al.*, 1999; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Observa-se, ainda, alterações menos frequentes, como o aumento das atividades da creatina cinase e lactato desidrogenase, sugestivo de miosite, tal como o aumento da troponina cardíaca I (Ciaramella *et al.*, 1997; Noli e Saridomichelakis, 2014).

Alterações imunológicas e relativas à análise de urina incluem títulos positivos de anticorpos antinucleares e redução da gravidade específica de urina, respetivamente (Koutinas *et al.*, 2001; Ciaramella *et al.*, 1997; Noli e Saridomichelakis, 2014).

## b) Avaliação citológica e esfregaços

A citologia é um procedimento valioso na prática clínica pela sua facilidade e rapidez de execução, pois necessita apenas de equipamento básico e tem uma elevada especificidade (Noli e Saridomichelakis, 2014).

A citologia consiste na observação de um esfregaço de tecido previamente biopsiado (pele, linfonodos, medula óssea ou de baço) corado com Giemsa e com ampliação de x600 a x1000x, em que se podem identificar formas amastigotas de *Leishmania* dentro ou fora dos macrófagos (Baneth e Aroch, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011). Aquando da preparação dos esfregaços, as células maciçamente infetadas podem rebentar e os parasitas encontrar-se extracelularmente. Estas amastigotas, com preferência pelos macrófagos, tendem a localizar-se nos tecidos onde existem maiores quantidades de células do SFM (Gramiccia, 2011). Contudo, pese embora o seu tropismo para os macrófagos, já foram encontradas em esfregaços sanguíneos e “buffy-coat” (camada flogística ou capa leucocitária) formas amastigotas de *Leishmania* em neutrófilos de cão e de gato. Isto sugere que os neutrófilos podem atuar como células de transporte hematógeno para o parasita. Embora esta hipótese ainda não esteja comprovada, foi sugerida para a espécie canina. Deste modo, os cães e gatos, sejam dadores de sangue, estejam em tratamentos imunossupressores ou antes de serem deslocados de zonas endémicas para não endémicas, devem ser sempre testados para *Leishmania* (Marcos *et al.*, 2009; Pennisi *et al.*, 2015).

Estes testes diagnósticos são justificáveis sempre que se verifica lesões na pele ou nas mucosas, aumento dos linfonodos ou outras lesões, em situações de suspeita clínica em que a serologia é negativa ou duvidosa (Pennisi *et al.*, 2015).

A probabilidade de encontrar o parasita varia conforme a amostra de tecido colhido, devendo o mesmo ser sempre ser rico em células do SFM, como por exemplo: medula óssea (70%), baço (40%), linfonodos (30%) e fígado (20%) (Vides *et al.*, 2011). Desta forma, na citologia devemos optar em primeiro pela pele (em caso de sinais cutâneos), seguida dos linfonodos e só depois realizar a punção aspirativa da medula óssea, baço e fígado, evitando sempre que possível de início uma abordagem mais invasiva (Noli e Saridomichelakis, 2014). Segundo Bresciani *et al.* (2010), a técnica de impressão pode revelar-se útil quando se trata de lesões cutâneas.

Como a amostra é geralmente obtida através de punção aspirativa por agulha fina (método invasivo), por vezes é difícil a deteção do parasita em cães aparentemente saudáveis

(Alvar *et al.*, 2004; Maia e Campino, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2010). É um diagnóstico bastante específico, também para gatos, mas requer sempre experiência e consome algum tempo no procedimento (Paltrinieri *et al.*, 2010).

Quando o resultado da citologia é positivo em situações que o animal demonstra sinais clínicos compatíveis com a doença, considera-se alcançado o diagnóstico da doença. Nos casos em que a citologia é negativa mas o animal apresenta sinais clínicos, outros exames de diagnóstico são cruciais para determinar se o animal está doente com leishmaniose ou outra doença com sinais similares (Paltrinieri *et al.*, 2010).

### **c) Avaliação histopatológica**

Na análise histopatológica utilizam-se cortes de órgãos suspeitos com recurso a coloração de rotina hematoxilina e eosina (H&E). É um procedimento moroso, que requer a visualização de formas amastigotas, podendo estas não ser facilmente encontradas comparativamente à citologia (Maia e Campino, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2010). Nesses casos, sem a visualização do parasita não é possível emitir um diagnóstico definitivo e deve-se recorrer a coloração de Giemsa ou técnica de imunohistoquímica (Maia e Campino, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2010; Noli e Saridomichelakis, 2014). Apesar de ser uma técnica pouco sensível, Moreira *et al* (2007) descreveram-na em animais post mortem, que os linfonodos poplíteos são o tecido de eleição para a deteção do parasita, seguido pelo baço e pela medula óssea (Maia e Campino, 2008). Por vezes podem também encontrar-se em cortes de fígado, estômago, intestino grosso, rins, mucosa oral, exsudados nasais e tecido ocular (Pennisi *et al.*, 2015).

Esta abordagem de diagnóstico é indicada para a leishmaniose cutânea, uma vez que em situações de LV, sem presença de sinais cutâneos, podemos dar prioridade a técnicas de diagnóstico menos invasivas (Paltrinieri *et al.*, 2010).

O padrão histológico mais encontrado é o de inflamação granulomatosa difusa, com infiltrado difuso de macrófagos, linfócitos e células plasmocitárias, e em menor número neutrófilos, eosinófilos e mastócitos. Quando se observa um grande infiltrado de eosinófilos, no caso dos gatos podemos estar perante o complexo granuloma eosinofílico felino, mas não podemos descartar a possibilidade de uma resposta menos comum de LFel (Navarro *et al.*, 2010).

Tabela 2 - Anomalias observadas na avaliação histopatológica.

Orgão	Possível alteração observada à histopatologia
Fígado	Hepatite granulomatosa multifocal junto à veia porta. Os granulomas são formados por vários macrófagos com formas amastigotas de <i>Leishmania</i> . Os hepatócitos podem conter uma grande quantidade de pigmento biliar sugestivo de colestase hepática (Leiva <i>et al.</i> , 2005; Pocholle <i>et al.</i> , 2012).
Linfonodos e baço	Redução do número de linfócitos e aumento do número de macrófagos com parasitas no interior (Hervás <i>et al.</i> , 1999; Leiva <i>et al.</i> , 2005). Aumento da atividade hematopoiética e presença de megacariócitos. A polpa branca pode observar-se atrofiada, contrariamente à polpa vermelha (Marcos <i>et al.</i> , 2009).
Rim	Glomerulonefrite membranosa associado a depósitos de hialina (Hervás <i>et al.</i> , 1999).
Estômago e intestino grosso	Infiltrado de macrófagos na submucosa e mucosa (Hervás <i>et al.</i> , 1999).
Olho	Trato uveal (íris, corpo ciliar e coróide), córnea, esclera e retina com formas amastigotas de <i>Leishmania</i> (Leiva <i>et al.</i> , 2005).

#### d) Cultura

A cultura de *Leishmania* *in vitro* permite uma identificação viável de formas promastigotas. Este método de diagnóstico é realizado em meios com base em ágar-sangue, exclusivo de laboratórios especializados. Os meios líquidos RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 ou de Schneider estão disponíveis comercialmente para o isolamento do parasita.

A cultura é um procedimento que nos permite isolar o parasita, mantendo a população original de leishmânias. Contudo, apesar da sua elevada especificidade, tem a desvantagem de culturas *in vitro* necessitarem de um longo período longo de incubação (cerca de 30 dias)

(Gradoni e Gramiccia, 2008; Gramiccia, 2011). Está sujeito a contaminações microbiológicas e a sua sensibilidade depende da carga parasitária da amostra (Maia e Campino, 2008; Patrineri *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011).

Ao contrário do que acontece com os seres humanos, os cães e os gatos não são bons candidatos à realização de cultura como forma de diagnosticar leishmaniose. Como em humanos a probabilidade de encontrar o parasita no sangue é maior em doentes VIH positivos, Grevot *et al.* (2005) sugerem que o mesmo pode acontecer em gatos com FIV (Grevot *et al.*, 2005).

#### **e) Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A PCR é um método molecular não invasivo, muito sensível e utilizado no diagnóstico direto de leishmaniose (Baneth e Aroch, 2008). Permite amplificar sequências específicas do genoma de *Leishmania* spp. e deteta pequenas quantidades do parasita em amostras biológicas (Paltrinieri *et al.*, 2010).

Quando os resultados de citologia e histopatologia são negativos, está indicado o diagnóstico por PCR em animais com sinais sugestivos de LCan (Paltrinieri *et al.*, 2010).

São três as técnicas de PCR mais utilizadas: a PCR tradicional ou convencional, a PCR “nested” e a PCR em tempo real ou quantitativa (qPCR). A PCR convencional consiste no uso de iniciadores específicos, “primers”, que são sequências de ADN complementares às sequências de ADN de *Leishmania*. A PCR “nested” realiza duas amplificações utilizando “primers” internos para aumentar a sensibilidade (Gramiccia, 2011; Paltrinieri *et al.*, 2010). A qPCR determina o ADN de *Leishmania* spp. como na PCR convencional e permite quantificar o número de cópias de ADN na amostra (Mattos *et al.*, 2008). Comparativamente à técnica convencional, esta última é mais rápida, reduz a probabilidade de contaminação e aumenta a sensibilidade (Maia e Campino, 2008; Morais *et al.*, 2013). Após terminado o processo terapêutico para a doença, a qPCR tem a capacidade de detetar até a ínfima quantidade de parasita nos tecidos, indicando-nos a probabilidade de recidiva da doença e permite monitorizar a infeção (Mattos *et al.*, 2008; Maia e Campino, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2010). Após a amplificação por PCR, podemos segmentar esse mesmo ADN amplificado com enzimas específicas, um método designado de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP). O tamanho dos fragmentos resultantes é depois medido fazendo uso de corrida de gel, permitindo-nos distinguir diferentes espécies de *Leishmania* (Gradoni *et al.*, 2002).

Para as várias técnicas de PCR podemos utilizar fluidos corporais (sangue, “buffy coat” e urina) e tecidos obtidos por biopsia (pele, pelo, conjuntiva, linfonodos, medula óssea e baço), com maior probabilidade de encontrar *Leishmania* na medula óssea, seguida dos linfonodos, pele, conjuntiva, “buffy-coat” e sangue periférico (Mattos *et al.*, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012; Noli e Saridomichelakis, 2014). Embora a recolha de sangue periférico seja mais aceite pelos tutores, fácil de obter e de testar, não é a melhor forma para identificar ADN de *Leishmania* utilizando determinado protocolos, uma vez que não é tão frequente o parasita estar presente no sangue como na pele ou tecidos linfoides (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2007; Baneth e Aroch, 2008; Maia e Campino, 2008).

Através de várias análises de PCR em tecidos de animais infetados descobriram-se resultados conflituosos, dependentes da técnica, método de armazenamento e protocolo de PCR empregue. Alguns órgãos do mesmo cão podem dar positivo enquanto outros dão negativo (Baneth e Aroch, 2008). Uma vez que *Leishmania* tem diferente tropismo para diferentes órgãos, a positividade do exame depende da amostra utilizada (Maia e Campino, 2008). Um resultado de PCR positivo indica-nos que o animal está infetado, mas não prova que seja essa infeção a responsável pelos sinais manifestados (Noli e Saridomichelakis, 2014). Por outro lado, o resultado de PCR negativo num animal clinicamente suspeito não elimina a possibilidade de infeção (Baneth e Aroch, 2008; Maia e Campino, 2008).

Estudos epidemiológicos demonstram que os cães podem ser seronegativos para *Leishmania* enquanto PCR positivos (Oliva *et al.* 2006; Baneth e Aroch, 2008), ou PCR negativos enquanto seropositivos (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Baneth e Aroch, 2008).

Tendo em conta que existem restrições para os testes serológicos de gatos, a PCR é considerada por alguns autores o meio ideal para diagnóstico de LFel (Martín-Sánchez *et al.*, 2007). Porém, Cardoso *et al.* (2010) sugeriram que nos gatos a seroprevalência para *Leishmania* pode ser superior à positividade no teste PCR. Assim, identificar o ADN do parasita em animais seronegativos pode levar ao aumento do número de animais infetados (Cardoso *et al.*, 2010).

Posto que, em cães aparentemente saudáveis expostos à infeção pode haver resultados duvidosos e até contraditórios, recomenda-se monitorizar os animais sem sinais clínicos de LCan e em estados de infeção inconclusivos, repetindo os testes a cada 3 meses (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

**f) Imunohistoquímica (IHQ)**

É uma técnica útil na confirmação do diagnóstico de LCan quando os parasitas não são identificados na citologia e quando o padrão histológico indica a doença. Uma vez que tem uma elevada sensibilidade na LV dependente da carga parasitária (Alvar *et al.*, 2004; Baneth e Aroch, 2008; Maia e Campino, 2008). A IHQ tem como objetivo localizar e identificar antígenos em diferentes tecidos, utilizando anticorpos associados a enzimas reveladoras (Lunedo *et al.*, 2012). Os anticorpos usados neste procedimento podem ser monoclonais ou policlonais anti-*Leishmania*, ou biotina em soros hiperimunes (Maia e Campino, 2008). A IHQ permite aumentar significativamente a percentagem de parasitas encontrados nos tecidos, mesmo que em baixas concentrações (Vides *et al.*, 2011).

Como outras técnicas de diagnóstico já descritas, a IHQ é um procedimento que exige bastante experiência por parte do observador, uma vez que são frequentes resultados falsos negativos e falsos positivos, ora pela carga parasitária ou reações cruzadas, respetivamente (Maia e Campino, 2008).

Quando realizada por um técnico experiente, a IHQ revela-se um teste útil para diagnóstico definitivo da infeção e da doença, uma vez que não requiere equipamento sofisticado e permite um resultado histopatológico valioso (Grevot *et al.*, 2005).

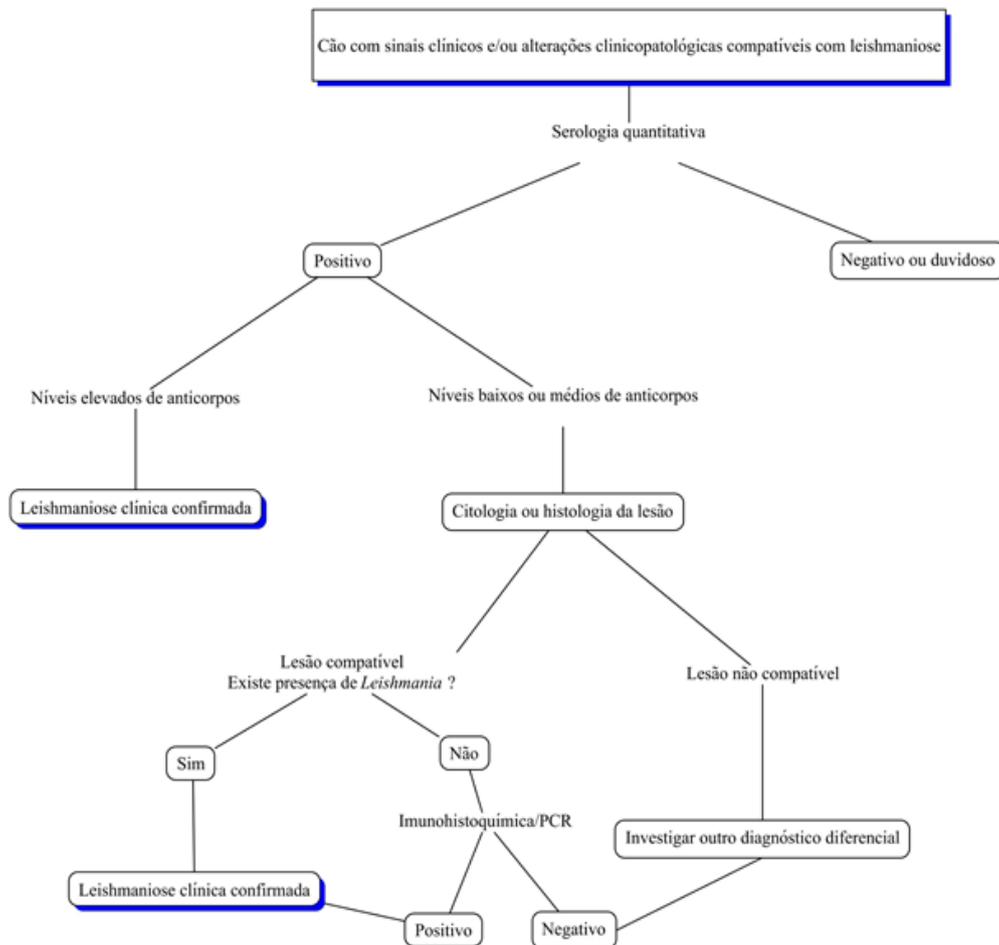


Figura 12 - Abordagem ao diagnóstico de cão com sinais clínicos compatíveis com LCan (adaptado de Baneth e Solano-Gallego, 2012).

## 1.8.2. Métodos Indiretos

### a) Imunofluorescência indireta (IFI):

O teste de IFI é por alguns considerado o padrão-ouro ou “gold-standard” do diagnóstico serológico de leishmaniose. Utiliza todo o corpo do parasita como antígeno, sendo valioso em estudos epidemiológicos, na prática clínica e no acompanhamento do tratamento (Alvar *et al.*, 2004; Maia e Campino, 2008; Proverbio *et al.*, 2014). Tal como outros métodos, requiere investimento laboratorial e experiência do operador, podendo ter como limitação variadas

diluições séricas necessárias ao procedimento, não o tornando prático e aplicável a um grande número de amostras (Maia e Campino, 2008).

O método consiste numa série de diluições a uma amostra de soro de um animal e testar em lâminas revestidas por antigénio de formas promastigota de *Leishmania* (Patrinieri *et al.*, 2010).

Nas amostras parasitadas, positivas, observa-se uma coloração homogénea verde fluorescente, enquanto no resultado considerado negativo se observa uma coloração avermelhada. Alguns autores mencionam para a IFI em cães infetados, uma sensibilidade entre 21,6% e 100% (Maia e Campino, 2008). Contudo, em estudos mais recentes, a técnica aplicada a cães de áreas endémicas, mostrou especificidades de 85.5% e 94.7% (Maia *et al.*, 2007). Outros autores experimentaram ainda aplicar IFI em formas promastigotas e amastigotas, tendo verificado maior sensibilidade nas formas amastigotas em cães com baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, sem perder especificidade (Maia e Campino, 2008).

Para avaliar a intensidade da fluorescência recorre-se a uma avaliação microscópica, subjetiva em títulos de baixa positividade (Gramiccia, 2011). Em concentrações baixas, esta avaliação pode ser difícil, revelando-se um teste de interpretação algo subjetiva (Patrinieri *et al.*, 2010).

Apesar de este ser um excelente método de diagnóstico da LCan, não existem ainda metodologias padronizadas para a espécie felina. Ocorre por vezes uma extrapolação do “cut-off” (limiar de positividade) dos cães para os gatos. Contudo, como as respostas imunitárias destas espécies são diferentes, os resultados podem ser complicados (Spada *et al.*, 2013)

Cada vez mais são utilizados os testes rápidos imunocromatográficos, pela sua fácil aplicabilidade, por poderem ser utilizados no consultório e por apresentarem resultados (qualitativos) quase imediatos. Todavia, embora a sua especificidade seja elevada, podem ter uma sensibilidade variável (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

#### **b) Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)**

O ensaio de imunoabsorção enzimática ou teste imunoenzimático (ELISA) é útil em laboratório pela sua aplicabilidade e análise de inúmeras amostras em simultâneo e em pouco tempo, adaptando-se a uma diversidade antigénica (Mettler *et al.* 2005; Maia e Campino, 2008). Consiste na colocação do soro do animal em placas com antigénio de *Leishmania*, ocorrendo

uma reação colorimétrica que pode ser quantificada através do uso de um espectrofotómetro (Paltrinieri *et al.*, 2010).

Este meio de diagnóstico serológico apresenta excelentes intervalos de sensibilidade e especificidade, perto dos 100%, excetuando as áreas endémicas para *Trypanosoma* spp. que podem levar ao surgimento de falsos positivos (Maia e Campino, 2008; Noli e Saridomichelakis, 2014). Para detetar LCan efetuam-se vários ensaios ELISA num curto período de tempo. Pelo facto de os cães com leishmaniose produzirem imensos anticorpos (Noli e Saridomichelakis, 2014), Solano-Gallego *et al.* (2003), utilizaram o ELISA na urina de cães proteinúricos e detetaram anticorpos anti-*Leishmania*.

Ao contrário dos cães, o método ELISA pode ser insuficiente em gatos, pela menor produção de anticorpos por parte destes últimos (Figueiredo *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2011). Deste modo, em gatos, é necessário fazer diluições mais concentradas em comparação com as realizadas com amostras de cães (Cardoso *et al.*, 2010).

Longoni *et al.* (2012) afirmaram que na mesma área geográfica, a seroprevalência em gatos era inferior à dos cães e defenderam que esta discrepância encontrada nos testes se devia ao facto de não utilizarem antigénios específicos para gatos, mas antes uma adaptação dos testes para cães.

Existem vários testes rápidos comerciais, que são bastante vantajosos pela utilização de sangue total, com elevada sensibilidade e especificidade, tornando-se ideais para a prática clínica (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

### **c) Teste de aglutinação direta (DAT)**

O teste de aglutinação direta (DAT) pode ser aplicado a plasma ou soro e utiliza, na sua totalidade, formas promastigotas coradas em suspensão ou liofilizado (Maia e Campino, 2008; Srividya *et al.*, 2012). Tem como objetivo encontrar anticorpos anti-*Leishmania* incubando o soro da amostra juntamente com o antigénio (Srividya *et al.*, 2012).

É um procedimento barato e simples de realizar, sendo ideal para aplicação no campo ou laboratório. Vários estudos em cães provenientes de áreas endémicas demonstram que o procedimento tem uma boa sensibilidade e especificidade (Maia e Campino, 2008).

Tem a desvantagem de apresentar um longo período de incubação (18 h), para além das várias diluições necessárias, limitando o número de amostras a analisar (Maia e Campino, 2008).

#### **d) Imunodeteção (WB)**

A imunodeteção ou “western blot” (WB) é uma técnica serológica que, para além do seu custo acima da média, requer experiência e tempo e não pode ser aplicada em diagnóstico de rotina (Ferroglio *et al.*, 2007; Maia e Campino, 2008). Permite detetar Ac anti-*Leishmania*, utilizando diferentes frações do parasita (Maia e Campino, 2008), e é bastante sensível e específico, comparativamente a outros métodos (Pennisi *et al.*, 2015). Contudo, a sua utilização é limitada na prática clínica dada a falta de padronização de resultados, custos elevados, mão de obra especializada e técnica demorada (Paltrinieri *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011).

É considerado sensível quando existe baixa titulação de anticorpos e é altamente específico para o diagnóstico de leishmaniose visceral (Gomes 2008; Maia e Campino, 2008). Tem importância no esclarecimento de casos de infeção subclínica com seropositividade baixa, constituindo uma técnica maioritariamente usada no âmbito experimental (Ferroglio *et al.*, 2007).

No crescente recurso à vacinação, como método profilático para a LCan, é frequente surgir interferência no diagnóstico, e encontrarmos cães com anticorpos anti-*Leishmania* que não resultaram da infeção natural (Solano-Gallego *et al.*, 2017).

### **1.8.3. Outros métodos de diagnóstico**

#### **a) Teste de Montenegro**

O teste de Montenegro, também conhecido como teste intradérmico indica-nos uma reação de hipersensibilidade do tipo retardado na pele relativamente ao contacto com o antigénio de *Leishmania*. Consiste na inoculação intradérmica de uma suspensão com formas promastigotas inativadas diluídas em solução salina, fenol ou mertiolato. Como controlo, é inoculada noutra zona da pele uma leishmanina (extrato de *Leishmania* com diluente). O tempo necessário para se obter uma leitura positiva, ou seja, endurecimento da região cutânea com um diâmetro superior a 5mm, pode variar entre 2 a 3 dias (Montenegro, 1926; Pinelli *et al.*, 1994; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Maia e Campino, 2008).

O resultado é considerado positivo quando se verifica uma reação local da inoculação, típico de infeção subclínica, em fase inicial da doença ou que responderam de forma eficaz ao tratamento (Solano-Gallego *et al.*, 2001). Geralmente, o teste de Montenegro é negativo durante

a doença ativa e positivo aquando a infeção subclínica, estágio inicial da doença ou após tratamento eficaz. No entanto, ambos os resultados devem ser revistos e deve-se ter em atenção que após vários testes seguidos há possibilidade de falsos positivos devido a sensibilização do antigénio. É um procedimento bastante simples e barato, sendo fácil de implementar na prática clínica, permitindo avaliar várias amostras (Maia e Campino, 2008).

## b) Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico consiste na criação de vetores flebotomíneos em laboratório para mais tarde picarem cães suspeitos de leishmaniose, que são previamente sedados e colocados em jaulas fechadas. Os insetos são então examinados após a digestão do sangue inoculado para pesquisa de formas promastigotas no seu tubo digestivo. É um método com elevada especificidade embora não seja aplicável na prática clínica (Gradoni e Gramiccia, 2008; Maia e Campino, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011).

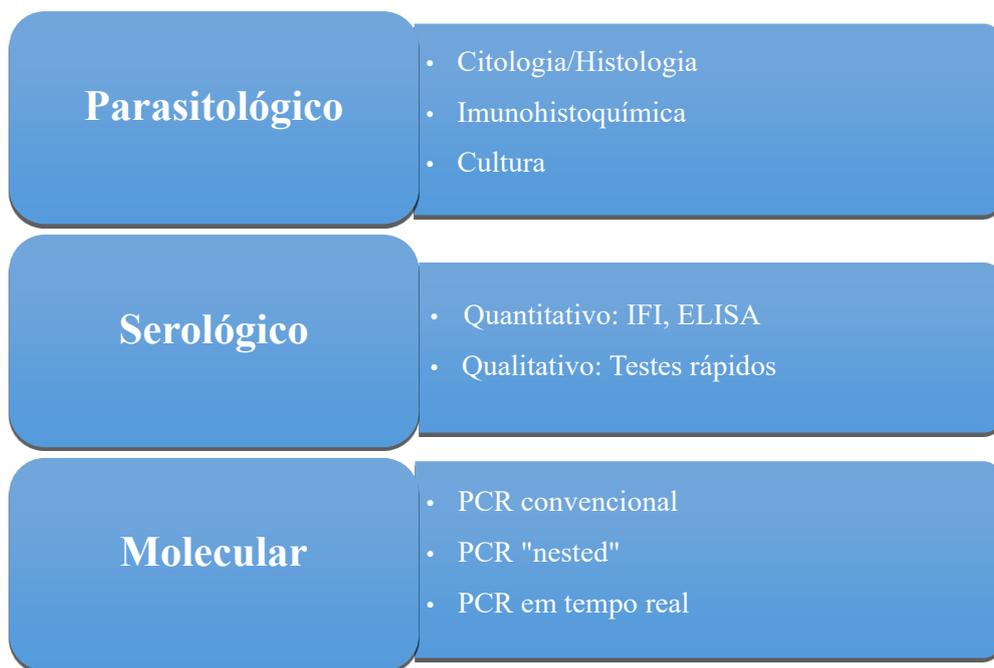


Figura 13 - Métodos de diagnóstico mais utilizados para a LCan (adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Em síntese, constatamos que os exames de diagnóstico (Figuras 12 e 13) efetuados para leishmaniose estão mais bem padronizados para cães comparativamente aos gatos. Ainda existem lacunas nas metodologias para felinos, tornando extremamente difícil comparar

resultados e estudos entre as espécies para a doença em questão (Noli e Saridomichelakis, 2014; Pennisi *et al.*, 2015). Além disso, os resultados obtidos por serologia e PCR podem revelar diferentes respostas num mesmo estudo epidemiológico (Pennisi, 2015). Devem-se tomar medidas para aperfeiçoar e padronizar resultados e métodos de diagnósticos para leishmaniose de cães e de gatos, complementando-os com testes específicos que permitam excluír outras doenças com sinais compatíveis com os da leishmaniose (Pennisi *et al.*, 2015).

## **1.9. Estadiamento e tratamento**

O tratamento de leishmaniose é prolongado e bastante dispendioso, devendo o tutor estar totalmente empenhado e o animal encontrar-se clinicamente estável para iniciar a terapêutica médica. É uma questão difícil, uma vez que iniciado o processo terapêutico para LCan pode ocorrer o aumento de títulos de anticorpos (Beugnet *et al.*, 2018) e o tratamento pode não ser totalmente eficaz (Miró *et al.*, 2008).

Os fármacos mais utilizados no tratamento de leishmaniose em cães e gatos, são o alopurinol, antimoniato de meglumina e miltefosina, estando os últimos dois licenciados na Europa (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Pennisi *et al.*, 2015). O plano terapêutico e a escolha dos fármacos a utilizar devem ter em consideração as diferentes formas clínicas da doença (Oliva *et al.*, 2010). O objetivo é controlar e resolver os sinais clínicos, melhorar a resposta celular específica para *Leishmania*, evitar recidivas, diminuir a concentração do parasita e a capacidade de o transmitir ao hospedeiro intermediário (Noli e Saridomichelakis, 2014).

Em cães, a leishmaniose apresenta uma maior resistência à terapêutica que a LV humana (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Na maioria dos casos não se consegue eliminar totalmente os protozoários, mas apenas alcançar a remissão dos sinais clínicos e alterações clínico-patológicas, condição designada de cura clínica (Miró *et al.*, 2008). A terapêutica pode ainda provocar uma diminuição no tempo, cerca de 4 meses, da infecciosidade dos animais tratados para os insetos vetores. Por vezes são necessários tratamentos sucessivos para contínua remissão dos sinais, podendo os animais permanecerem serológica e parasitologicamente positivos (Baneth e Aroch, 2008).

A resposta clínica de cães doentes ao tratamento pode variar de fraca a boa, dependendo do seu estado inicial e a sua resposta ao tratamento aplicado. Caso o animal apresente sinais de IR, deve-se restabelecer primeiro os fluidos e o equilíbrio ácido-base antes de iniciar o tratamento etiológico (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Admite-se que cães com um quadro de

IR tenham uma percentagem de recuperação inferior comparativamente àqueles que não desenvolvem comprometimento renal ou, simplesmente, possuem proteinúria moderada (Solano-Gallego *et al.*, 2011). A quase totalidade dos cães sujeitos ao tratamento revela melhorias clínicas durante o primeiro mês, embora noutros seja necessário um período mais longo para se observar qualquer tipo de melhoria clínica. Os níveis de proteínas séricas e os títulos de anticorpos requerem um maior período de tempo até atingirem os valores normais (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Para uma execução de um plano terapêutico mais eficaz, criou-se um sistema de estadiamento clínico baseado nos sinais clínicos, alterações clinicopatológicas e condição sorológica, proposto pelo grupo LeishVet (Tabela 3). O modelo de classificação da doença abrange um amplo espectro de manifestações e níveis de gravidade da LCan. Existe um tratamento e prognóstico correspondente ao estágio da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Dado o papel desempenhado pelos animais de companhia como hospedeiros intermediários, e o potencial zoonótico da doença, a eutanásia poderá ser aceitável perante um mau estado geral e um prognóstico desfavorável (Beugnet *et al.*, 2018).

Tabela 3 - Estadiamento clínico para a LCan baseado na serologia e manifestações clinicopatológicas (adaptado de Sollano-Galego, 2011)

<b>Estádio clínico</b>	<b>Serologia *</b>	<b>Sinais clínicos</b>	<b>Alterações laboratoriais</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Prognóstico</b>
<b>Estádio I Doença suave</b>	Níveis de anticorpos negativos a positivos baixos	Cães com sinais clínicos suaves como linfadenomegalia periférica ou dermatite papular	Usualmente sem anomalias clinicopatológicas observadas. Perfil renal normal: creatinina < 1.4 mg/dl; não proteinúrico: UP/C < 0.5	Negligência científica/alopurinol ou antimoniato de meglumina ou miltefosina/alopurinol + animonito de meglumina ou alopurinol + miltefosina**	Bom
<b>Estádio II Doença moderada</b>	Níveis de anticorpos positivos baixos a elevados	Cães que além dos sinais descritos no estágio I, apresentem: lesões cutâneas difusas ou simétricas como dermatite esfoliativa/onicogribose, ulcerações (plano nasal, almofadas	Anomalias clinicopatológicas como anemia não regenerativa, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade sérica.	Alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol + miltefosina	Bom a reservado

plantares, proeminências ósseas, junções mucocutâneas), anorexia, perda de peso, febre e epistaxis.

Subestádios  
 a) Perfil renal normal: creatinina < 1.4 mg/dl; não proteinúrico: UP/C < 0.5  
 b) Creatinina < 1.4 mg/dl; UP/C = 0.5-1

<b>Estádio III Doença severa</b>	Níveis de anticorpos positivos médios a elevados	Cães que além dos sinais descritos nos estádios I e II apresentem sinais originados por lesões de complexos imunes: vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite.	Anomalias clinicopatológicas descritas no estágio II. Doença renal crônica (DRC) estágio I IRIS com UP/C > 1 ou estágio II (creatinina 1.4-2 mg/dl)	Alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol + miltefosina  Seguir as guidelines para DRC da IRIS	Reservado a mau
<b>Estádio IV Doença muito severa</b>	Níveis de anticorpos positivos médios a elevados	Cães que apresentem os sinais clínicos descritos no estágio III. Tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótica ou estágio final de doença renal.	Anomalias clinicopatológicas descritas no estágio II. Estádio III de DRC IRIS (creatinina 2-5 mg/dl) e estágio IV (creatinina > 5mg/dl) Síndrome nefrótica: proteinúria marcada com UP/C > 5	Alopurinol (apenas) Seguir as guidelines para DRC da IRIS	Mau

\*Nos cães com níveis de anticorpos negativos a positivos médios deve-se confirmar o diagnóstico de infecção por citologia, histologia, IHQ ou PCR. Elevados níveis de anticorpos, definidos como 3 a 4 vezes acima dos valores de referência estabelecidos, são conclusivos de LCan.

\*\*Cães no estágio I necessitam provavelmente de um tratamento menos prolongado, com um ou dois fármacos combinados ou, alternativamente, monitorização sem tratamento. No entanto, existem informações limitadas sobre cães neste estágio necessitando as opções de tratamento de serem bem definidas.

### 1.9.1. Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes foram durante muito tempo os fármacos de eleição para tratamento da leishmaniose em cães e seres humanos. Atuam inibindo as enzimas protozoárias responsáveis pela glicólise e oxidação dos ácidos gordos (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

O fármaco mais utilizado no tratamento de leishmaniose é o antimoniato meglumina, de nome comercial Glucantime®, administrado por via subcutânea (SC), intramuscular (IM) ou endovenosa (IV), a uma dose de 75-100 mg/kg, SID ou 40-75 mg/kg, BID (Ramsey, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011). A posologia mais frequentemente utilizada no tratamento de leishmaniose em cães e gatos tem a dose diária de 100mg/kg, administrada subcutaneamente, durante 30 dias (Beugnet *et al.*, 2018). O antimoniato de meglumina possui uma ação nefrotóxica e está associada a potenciais efeitos indesejados como celulite cutânea ou abscessos no local de inoculação (Tassi *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Durante a primeira semana de tratamento é usual observarem-se manifestações associadas ao tratamento, podendo atingir órgãos vitais, como o fígado e os rins, especialmente em cães debilitados ou com um quadro de IRC, sendo necessária terapia de suporte com protetores hepático e diuréticos (Beugnet *et al.*, 2018).

Em determinados países europeus, como França, Espanha e Itália, foram relatados casos de desenvolvimento de resistência de estirpes de *L. infantum* ao antimoniato de meglumina (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

### **1.9.2. Análogos das purinas**

O alopurinol, fármaco licenciado para o tratamento da gota em seres humanos, pode ser utilizado como leishmanioestático em cães, embora não esteja descrito para a doença. Os análogos das purinas, nomeadamente o alopurinol, com poder leishmanioestático, tornou-se um fármaco fundamental no combate à doença. É utilizado diversas vezes em combinação com outros fármacos, entre os quais os próprios antimonias (Baneth e Solano-Gallego, 2012; Saz-Villanueva *et al.*, 2013).

A dose administrada recomendada por via subcutânea é de 15 mg/kg, de 12-12 h durante 30 dias, podendo ser prolongada conforme o caso (Beugnet *et al.*, 2018). Quando administrado de forma isolada, a dose utilizada é de 10 mg/kg, de 12-12 h, PO, durante um mínimo de 6-12 meses (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A melhoria do estado clínico, associada à redução do número de parasitas, pode ser observada 4 semanas após o início do tratamento, podendo, no entanto, haver recorrência após a descontinuação do mesmo (Baneth e Solano-Gallego, 2012; Beugnet *et al.*, 2018). Estão descritos casos de cães que sofreram em média uma recorrência ou recidiva a cada 6 meses. O alopurinol não elimina a totalidade dos parasitas e ainda podemos encontrar *Leishmania* em

culturas e PCR de sangue periférico e punções de medula óssea ou de linfonodos (Beugnet *et al.*, 2018).

A duração do tratamento deve ser definida conforme o estadiamento da doença, a resposta clínica e tolerância individual ao fármaco. Alguns cães são extremamente dependentes, não permitindo a descontinuação, enquanto outros controlam a infecção num período mais reduzido (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Efeitos adversos ao tratamento podem agravar a função renal e causar causa hiperxantúria, e originar, ocasionalmente, urolitíase. No entanto, ocorre uma melhoria do estado geral do animal e resolução das lesões cutâneas (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Perante um quadro de hiperxantúria, o animal deve passar a consumir dietas pobres em purinas ou deverá reduzir-se a dose de alopurinol ou até interromper-se o tratamento. Para além desta situação, a terapia deve ser descontinuada, excepcionalmente, na presença de uma recuperação completa e avaliada, ou perante uma marcada diminuição dos níveis de anticorpos (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Apesar de o alopurinol funcionar bem em gatos com leishmaniose, não existem estudos suficientes sobre a farmacocinética e farmacodinamia deste princípio ativo nesta espécie hospedeira. É sempre aconselhada a monitorização dos parâmetros renais e hepáticos devido à possibilidade de ocorrer sinais de IRA e o aumento dos níveis das enzimas hepáticas ALT e AST (Pennisi, 2015).

Vários autores descrevem casos de gatos sujeitos a terapêuticas com alopurinol como único princípio etiotrópico, em diferentes doses, com resultados bastante satisfatórios. Leiva *et al.* (2005) administraram 10 mg/kg/PO/BID de alopurinol durante 6 meses e obtiveram uma melhoria satisfatória de sinais clínicos, redução dos níveis da gamopatia policlonal e dos títulos de Ac para *Leishmania* no soro. Pocholle *et al.* (2012) descreveram um caso de uma remissão total dos sinais cutâneos depois da administração de alopurinol, 100 mg/PO/SID, durante 4 meses (Pocholle *et al.*, 2012). Romero *et al.* (2012) ensaiaram uma dosagem superior de alopurinol, de 20 mg/kg SID, durante 21 dias, num gato naturalmente infetado por *Leishmania*, obtendo uma melhoria dos sinais clínicos, analítica bioquímica e testes serológicos.

### **1.9.3. Miltefosina**

A miltefosina, de nome comercial Milteforan®, é um fármaco utilizado recentemente na terapia de leishmaniose. Trata-se de um alquilfosfolípido com efeito tóxico direto sobre as

leishmânias e com ação antimetabólica e leishmanicida, induzindo uma alteração da biossíntese de glicolípidos e glicoproteínas na membrana do parasita (Miró e Moreno, 2006; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

A sua administração é realizada por via oral, a uma dose de 2 mg/kg/dia durante 4 semanas (Baneth e Solano-Gallego, 2012; Beugnet *et al.*, 2018). Os efeitos adversos descritos incluem alterações gastrointestinais, como vômitos, diarreia e anorexia (Miró e Moreno, 2006).

#### **1.9.4. Antimoniato de meglumina com alopurinol**

O tratamento combinado de antimoniato de meglumina e alopurinol é considerado a terapêutica mais eficaz e o protocolo mais utilizado contra a leishmaniose em cães e gatos. Esta terapia tem a duração de 4-8 semanas, seguida de uma continuação do alopurinol, isoladamente, durante 6-12 meses (Baneth e Solano-Gallego, 2012; Pennisi *et al.*, 2015). Para além de reduzir o risco de falha terapêutica, esta combinação de fármacos permite uma melhor eficácia em termos clínicos, comparativamente com os tratamentos isolados (Beugnet *et al.*, 2018).

Para combater a leishmaniose felina tem sido utilizado antimoniato de meglumina associado a alopurinol. Com elevada tolerância nas populações de gatos, inicia-se o tratamento com alopurinol, PO, seguido de antimoniato de meglumina, por via subcutânea (Pennisi *et al.*, 2015). Diferentes autores referem dosagens distinta na eficácia deste tratamento em gatos, mas Mattos *et al.* (2008) sugere a combinação de 10 mg/kg de alopurinol, duas vezes ao dia, por via oral, juntamente com 5 mg/kg ou 20 mg/kg de antimoniato de meglumina, por via subcutânea (Mattos *et al.*, 2008).

#### **1.9.5. Combinação de miltefosina com alopurinol**

Segundo Solano-Gallego *et al.* (2009), a terapêutica combinada de miltefosina com alopurinol é uma alternativa à combinação de antimoniato de meglumina com alopurinol (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Está descrita a administração de miltefosina, 2 mg/kg por dia, por via oral SID, durante 28 dias consecutivos. Quando administrada isoladamente ou combinada com alopurinol deve ser realizada na dose de 10 mg/kg, duas vezes ao dia, por via oral, durante vários meses. De acordo com Oliva *et al.* (2010), após um mês do início deste plano terapêutico, cães tratados apresentaram uma melhoria clínica progressiva, com uma diminuição da carga de ADN de *Leishmania* nos linfonodos e diminuição do título de anticorpos

séricos anti-*Leishmania*. A miltefosina demonstra uma melhoria na eficácia clínica quando utilizada em conjunto com alopurinol, comparativamente ao seu uso isolado (Oliva *et al.*, 2010).

#### **1.9.6. Anfotericina B**

A anfotericina B é um macrólido polieno utilizado como antifúngico, cujo mecanismo de ação consiste em aumentar a permeabilidade da membrana dos protozoários (Oliva *et al.*, 2010). É um fármaco pouco usual em medicina veterinária, que quando administrado em cães, por via endovenosa, permite a cura clínica (Oliva *et al.*, 2010). O seu mecanismo consiste na ligação ao ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana celular, com posterior saída de iões, água e outras moléculas, causando a morte celular por plasmólise. Possui alguns efeitos secundários, tais como nefrotoxicidade, responsável pela vasoconstrição renal e redução da taxa de filtração glomerular, com possível atuação direta nas células epiteliais renais (Miró *et al.*, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Outros sinais observados após a administração de anfotericina B são as periflebitas, febre, anorexia, vômito, icterícia, entre outros (Noli e Auxilia, 2005).

#### **1.9.7. Outros**

Outros fármacos, de segunda linha, têm sido descritos por vários autores com eficácia anti-*Leishmania*, sendo necessário mais estudos clínicos para verificar o seu valor terapêutico (Miró *et al.*, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Na LCan são conhecidos imunomoduladores (domperidona, prednisona/ prednisolona), antibióticos (aminosidina, marbofloxacina, espiramicina) e derivados do imidazol (metronidazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol) no tratamento de leishmaniose (Meireles, 2008; Baneth e Solano-Gallego, 2012; Saz-Villanueva *et al.*, 2013; Beugnet *et al.*, 2018). Contudo, estudos demonstram que fármacos como o cetoconazol, o metronidazol, fluconazol, itraconazole e espiramicina não tiveram efeito na leishmaniose felina (Mattos *et al.*, 2008; Pocholle *et al.*, 2012; Pennisi *et al.*, 2015).

Surgiu recentemente no mercado, um produto para o combate a LCan, Leisguard®, cujo princípio ativo é domperidona. Atua estimulando a resposta celular do animal e aumenta a capacidade leishmanicida dos leucócitos fagocíticos responsáveis por eliminar o parasita. Apresenta-se sob a forma de suspensão oral, de cor amarela e deve ser administrado uma vez

ao dia e juntamente com o alimento. A dose recomendada é de 0,5 mg/kg/dia ou 1 ml por cada 10 kg de peso vivo, durante 4 semanas consecutivas. Tem a vantagem de reduzir o risco de desenvolvimento de uma infecção activa e doença clínica após o contacto com *L. infantum*; e controlar a progressão clínica da LCan em estádios iniciais. A terapêutica deve ser iniciada imediatamente após o diagnóstico para ajudar os cães a autolimitarem a doença. Não deve ser administrada em cães com hipersensibilidade à domperidona, ou excipientes, com insuficiência hepática, tumor hipofisário produtor de prolactina, hemorragia gastrointestinal, obstrução mecânica ou perfuração (DGAV, 2017).

Hervás et al. (1999) administraram a um gato com LFel, 5mg/kg, via subcutânea, de antimoniato de meglumina, juntamente com cetoconazol, 10 mg/kg, via oral, durante três ciclos de 4 semanas separados entre si por 10 dias, verificando-se a resolução dos sinais cutâneos (Hervás *et al.*, 1999). Pennisi (2002) aplicou um protocolo terapêutico com fluconazol, metronidazol e espiramicina a um gato de 7 meses, que se revelou ineficaz. Passados 5 meses foi-lhe administrado itraconazol durante 60 dias, não mostrando igualmente melhorias clínicas, terminando em eutanásia por complicações clínicas. No mesmo estudo, mas para outro animal administrou-se apenas alopurinol (20 mg/Kg por dia, via oral, durante 8 meses) e interferão gama (30 UI por dia) topicamente na mucosa oral durante 4 meses, obtendo-se por fim um resultado satisfatório com remissão (Pennisi, 2002).

A aminosidina é um antibiótico aminoglicosídeo com uma boa eficácia clínica. No entanto, é necessário respeitar a dosagem correta e pode ter efeitos secundários indesejados se administradas doses superiores a 20 mg/kg (Noli e Auxilia, 2005; Noli e Saridomichelakis, 2014). Um estudo recente, levado a cabo por Athanasiou *et al.* (2013) demonstrou a eficácia da administração de aminosidina (15 mg/kg, durante 12 dias) a cães em estágio I e IIa da doença, revelando melhoria dos parâmetros clínicos, serológicos e parasitológicos, sem qualquer recorrência ou recidiva nos 3 meses seguintes (Athanasiou *et al.*, 2013; Noli e Saridomichelakis, 2014).

A marbofloxacina é uma fluorquinolona de segunda geração desenvolvida para a medicina veterinária, com menor eficácia anti-*Leishmania* quando comparada com a miltefosina (Noli e Saridomichelakis, 2014). Um estudo envolvendo 24 cães com LCan, tratados com marbofloxacina (2 mg/kg, via oral, em ciclos de 10-40 dias durante 9 meses) revelou uma eficácia de 67%, com marcada diminuição da densidade parasitária nos linfonodos. Os autores concluíram que elevadas dosagens ou períodos de tratamento mais longos, em nada

beneficiavam os resultados, uma vez que apenas três desses cães recidivaram 9 meses após o estudo (Rougier *et al.*, 2008; Noli e Saridomichelakis, 2014).

Os fármacos prescritos para a leishmaniose podem estar relacionados com os sinais clínicos exibidos. A utilização de diuréticos no tratamento da doença sempre foi discutida, demonstrando melhorias clínicas em casos de poliartrite e alterações a nível ocular, através do uso de corticosteroides em doses imunossupressoras. Quando ocorre o envolvimento do complexo imunitário aconselha-se a administração de prednisolona durante 15 a 20 dias, que reduz a síntese de anticorpos e permite a resolução das lesões. Esta corticoterapia pode ser considerada em situações que os valores de ureia no sangue sejam superiores a 1,5 g/l (Beugnet *et al.*, 2018).

Os resultados da terapêutica são por vezes ambíguos, especialmente em gatos. Observa-se animais que sem tratamento apresentam uma melhoria clínica e uma esperança média de vida de 5 anos, enquanto animais tratados continuamente com alopurinol que acabam por desenvolver comprometimento renal (Mattos *et al.*, 2008).

Tabela 4 - Protocolos de tratamento mais utilizados para leishmaniose em cães e gatos (adaptado de: Hervás *et al.*, 1999; Sollano-Galego *et al.*, 2011; Pennisi 2015; Pennisi *et al.*, 2015; DGAV, 2015; Pimenta *et al.*, 2015).

<b>Princípio ativo</b>	<b>Dose recomendada para gatos</b>	<b>Dose recomendada para cães</b>	<b>Efeitos secundários</b>
Alopurinol	10-15 mg/kg/BID/PO; 20 mg/kg/SID/PO; 25 mg/BID/PO; 100 mg/SID/PO	10 mg/kg/BID/PO durante 6-12 meses	Urulotíase das xantinas <sup>e)</sup>
Antimoniato de meglumina <sup>a)</sup>	20-50 mg/kg/SID/SC durante 20-30 dias; 175 mg a cada 48 h, IM durante 55 dias; ou 5mg/kg/SID/SC <sup>b)</sup>	75-100 mg/kg/SID/SC <sup>c)</sup> ; 40-75 mg/kg/BID/SC <sup>c)</sup> durante 4 semanas	Potencial nefrotóxico <sup>d)</sup> , celulite e abscessos cutâneos <sup>e)</sup>
Miltefosina <sup>a)</sup>		2 mg/kg/SID/PO durante 28 dias	Vómitos e diarreia <sup>e)</sup>
Fluconazol	5 mg/kg/SID/PO durante 2 meses		IRC e possível Nefrotoxicidade <sup>d)</sup>

Itraconazol	50 mg/SID/PO durante 2 meses	IRC e possível Nefrotoxicidade <sup>f)</sup>
Espiramicina <sup>d)</sup>	150.000 IU/kg/SID/PO durante 35 dias	IRC e possível Nefrotoxicidade <sup>f)</sup>
Metronidazol <sup>d)</sup>	25 mg/kg/SID/PO durante 35 dias	Vômitos, hepatotoxicidade, neutropenia e sinais neurológicos <sup>e), f)</sup>

<sup>a)</sup> Fármacos recomendados, frequentemente, em combinação com alopurinol.

<sup>b)</sup> Dosagem recomendada para combinações entre antimoniato de meglumida com ketoconazol (10 mg/kg/SID/PO), em 3 ciclos de tratamento com 4 semanas, com 10 dias de intervalo.

<sup>c)</sup> Se o paciente não apresentar melhorias significativas pode-se prolongar a terapêutica até 2-3 semanas.

<sup>d)</sup> No tratamento de LFel, a espiramicina deve ser sempre combinada com metronidazol.

<sup>e)</sup> Efeitos secundários descritos em cães.

## 1.10. Monitorização

A monitorização durante e pós-tratamento é fundamental para evitar recorrências (Solano-Gallego, 2009; Oliva *et al.*, 2010; Noli e Saridomichelakis, 2014). Os parâmetros físicos e laboratoriais (hematológicos, bioquímica sérica, eletroforese de proteínas séricas, análise de urina, com UP/C, etc.) devem ser monitorizados após o primeiro mês de tratamento, e depois disso a cada 3-4 meses até uma completa recuperação, seguido de monitorização a cada 6-12 meses (Solano-Gallego, 2009; Roura *et al.*, 2013; Noli e Saridomichelakis, 2014). Para quantificar a diminuição da carga parasitária deve-se recorrer a PCR em tempo real para monitorizar e avaliar o sucesso do tratamento (Roura *et al.*, 2013), uma vez que o seu aumento é indicativo de uma provável recorrência de LCan (Noli e Saridomichelakis, 2014). Quando após um ciclo de tratamento, o animal não evoluir favoravelmente, avalia-se a necessidade de aplicar um novo ciclo terapêutico com possível mudança de fármaco ou da dose administrada. A presença de doenças concomitantes não deve ser desprezada em momento algum (principalmente as doenças parasitárias causadas por agentes transmitidos por outros vetores), pois podem impedir uma resposta eficaz, por parte do animal, ao tratamento aplicado contra a leishmaniose (Miró e Moreno, 2006).

### 1.11. Profilaxia

É quase impossível controlar quimicamente o ambiente externo, devendo sempre evitar-se os insetos vetores através de procedimentos básicos (Beugnet *et al.*, 2018). Existe uma grande oferta no mercado no que diz respeito a medidas de prevenção contra a picada de insetos vetores, através de inseticidas com efeito anti-picada (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Medidas comportamentais também devem ser aplicadas: manter os cães no interior de casa durante o período sazonal dos vetores e durante o crepúsculo, ou seja, anoitecer e amanhecer (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Beugnet *et al.*, 2018); e reduzir os possíveis micro-habitats para vetores, como amontoados de madeira e pedra, na região que rodeia a habitação ou outros locais a que o animal tem acesso. É aconselhável a utilização de inseticidas e fármacos de uso veterinário, como permetrina, deltametrina e flumetrina (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Existem moléculas com efeito repelente de vetores, inseticidas tópicos, encontrados sob a forma de soluções para unção punctiforme (“spot-on”), “sprays” e coleiras (Baneth e Solano-Gallego, 2012; Beugnet *et al.*, 2018). A atividade destes repelentes depende da concentração inicial, do método de apresentação/aplicação, do animal como indivíduo, da sua forma de vida e das condições climáticas (incluindo temperatura e humidade) (Beugnet *et al.*, 2018). Os “spot-ons” possuem permetrina com ou sem imidaclopride e recomenda-se a sua administração a cada 3 semanas, ou, em caso de viagem para zona endémica, devem ser aplicados pelo menos nos 2 dias antecedentes à mesma. As coleiras (como por exemplo: Seresto®) estão impregnadas com deltametrina ou flumetrina e conferem proteção durante 6 meses, período após o qual devem ser substituídas. As coleiras antiparasitárias devem ser aplicadas, pelo menos 1-2 semanas antes de qualquer viagem (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Atualmente, existem vacinas de proteínas recombinantes ou de excreção/secreção de proteínas (ESP) de *L. infantum*, comercializadas por todo o continente europeu e América do Sul. Com o objetivo de ativar a imunização a *Leishmania* em cães seronegativos a partir dos 6 meses de idade, reduzindo o risco de desenvolver infeção ativa e quadro clínico após contactar com *L. infantum* (Beugnet *et al.*, 2018; Cotrina *et al.*, 2018). O plano de vacinação recomendado consiste na administração de 3 doses com uma na primovacinação e reforços anuais (Beugnet *et al.*, 2018).

As vacinas de frações purificadas, a Leishmune® e a LeishTech®, são comercializadas no Brasil e parecem bastante eficazes na profilaxia da LCan (Solano-Gallego *et al.*, 2017). Na

Europa, existem apenas duas vacinas para LCan, a CaniLeish® (Virbac Santé Animale, França) e a Letifend® (Laboratorios Leti, Espanha). A primeira é composta por ESP e adjuvante de extrato purificado de *Quillaja saponaria* (QA-21), enquanto a segunda, é constituída pela proteína Q recombinante (com 5 fragmentos de antígenos de 4 proteínas de *L. infantum*) e não tem adjuvante (Solano-Gallego *et al.*, 2017). A Letifend é a vacina mais recente e constitui um avanço importante no controlo e profilaxia da LCan, com uma elevada eficácia em áreas endémicas da Europa (Cotrina *et al.*, 2018). Contudo, ainda não existem estudos no que diz respeito à vacinação anti-leishmaniose em gatos (Pennisi *et al.*, 2015).

### **1.12. Prognóstico**

No que concerne ao prognóstico de um animal com leishmaniose, devemos ter em atenção o seu estado clínico, gravidade das lesões, progressão da doença e resposta imunitária individual (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Para animais clinicamente afetados o prognóstico vai depender da presença inicial de doença renal crónica grave e se foram sujeitos a tratamento e monitorização de acordo com as normas orientadoras disponíveis (Solano-Gallego *et al.*, 2009, 2011; Noli e Saridomichelakis, 2014). Em situações em que o animal não atinge um estado de IR, o tratamento é, frequentemente, eficaz, melhorando os sinais clínicos a nível dérmico e visceral (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Geisweid *et al.* (2012) reportaram uma média de sobrevivência de 4,7 anos em animais tratados, um período significativamente maior em cães sem hipoalbuminemia, proteinúria e azotemia renal, enquanto outros estudos sugerem uma sobrevivência de 75% após 4 anos, em animais sem doença renal crónica (Roura *et al.*, 2013; Noli e Saridomichelakis, 2014). Estudos realizados por Torres *et al.* (2011), em 23 cães com LCan, referem que caso o tratamento e a monitorização seja adequada, animais no estágio II da doença podem ter um período de sobrevivência superior a 9 anos, com boa qualidade de vida, em que apenas 3 cães experienciaram recidivas.

No que diz respeito aos gatos, assim como acontece nos cães, o prognóstico pode variar de bom a desfavorável dependendo de inúmeros fatores. Os animais podem viver vários anos, sujeitos a terapêutica médica ou não, antes que ocorra agravamento do seu estado clínico, nomeadamente o comprometimento renal. A presença de hiper-gamaglobulinemia está descrita como responsável pelo aumento de deposição de imunocomplexos nas membranas renais, o que predispõe ao desenvolvimento de IR (Pennisi, 2015). A leishmaniose é responsável por

afetar diversos sistemas orgânicos mas sabe-se que estas condições diminuem a esperança de vida, e por isso devem ser monitorizadas adequadamente (Pennisi *et al.*, 2015).

Após o tratamento os animais podem manter condições satisfatórias por vários meses, mas usualmente progride para caquexia e morte. Apenas 10% dos cães se mantêm portadores assintomáticos ou conseguem eliminar o parasita. É uma doença crônica em que o tratamento não é suficiente para neutralizar ou eliminar totalmente o parasita do seu hospedeiro intermediários, havendo várias recorrências e/ou recidivas (Beugnet *et al.*, 2018).

### **1.13. Implicações na Saúde Pública**

Aproximadamente 12 milhões de seres humanos estão infetados com *Leishmania* e 350 milhões estão em risco de adquirir a infecção e a doença, com uma incidência anual de 1,5 milhões de novos casos na forma cutânea da doença e cerca de 500 mil novos casos com a forma visceral, potencialmente fatal (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Atualmente, a maioria dos casos observados provém de indivíduos imunodeprimidos, especialmente infetados com VIH (Beugnet *et al.*, 2018).

Solano-Gallego *et al.* (2009) consideraram que os cães são o reservatório doméstico mais importante de transmissão de *L. infantum* para os humanos. A proximidade entre cães infetados e seres humanos está certamente associada à transmissão da infecção, mas a presença de animais com LCan em ambiente familiar não parece contribuir significativamente o risco de infecção à população que o rodeia quando a transmissão já está a acontecer na região (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A maioria dos insetos vetores são zoofílicos, assim sendo, o perigo para os tutores de cães com leishmaniose parece ser mínimo. Existe uma maior prevalência da infecção nos animais e está amplamente mais distribuída comparativamente à infecção nos seres humanos (Cortes *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Apesar de os cães serem considerados o reservatório primário (Dantas-Torres, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009), os gatos são potenciais reservatórios secundários da doença (Dedola *et al.*, 2018). Embora os gatos não evidenciem conseguir sustentar o caráter endêmico da infecção numa determinada área geográfica, contribuem para reforçar o papel dos cães (Maia e Campino, 2011; Dedola *et al.*, 2018).



## 2. DESCRIÇÃO DOS CASOS

### 2.1. Caso clínico nº 1

#### 2.1.1. Identificação

<b>Nome</b>	<b>Black Jack</b>
<b>Data de nascimento</b>	02-maio-2013
<b>Espécie</b>	Canina
<b>Raça</b>	Pastor Alemão
<b>Sexo</b>	Macho
<b>Pelagem</b>	Média, de cor preta

#### 2.1.2. História pregressa

Eram conhecidas apenas duas ocorrências clínicas anteriores: otite unilateral por *Malassezia* spp. no ouvido esquerdo, tendo sido tratada com Omniotic® (princípios ativos: ácido acetilsalicílico, propilenoglicol e imidazolidina; fabricante: HiFarmaX) e Conofite® (miconazol, prednisolona e polimixina B; Esteve; posologia: duas vezes ao dia, durante 7 dias); e otite traumática por corpo estranho (pragana) no interior do ouvido esquerdo, que foi retirada durante a consulta prescrevendo-se Otodine® (digluconato de clorexidina e Tris-EDTA; ICF) e Conofite®.

#### 2.1.3. Motivo da consulta

O Black Jack foi apresentado à consulta no Hospital Veterinário do Restelo (HVR) (Lisboa, Portugal) na noite de 6 de setembro de 2017 com epistaxe (Figura 14) unilateral esquerdo.



Figura 14 - Imagem adaptada de Solano-Gallego *et al.* (2011) para ilustrar o caso clínico nº 1.

#### **2.1.4. Anamnese e exame físico**

Apurou-se que a epistaxe durava por algumas semanas, sempre unilateral, do lado esquerdo, com episódios recorrentes que apenas cessavam por volta do 2º dia após o seu início. É um animal que vive dentro de portas, mas os tutores referiram que nos últimos dias encontraram uma carraça, embora o Black Jack tivesse uma coleira antiparasitária externa Scalibor® (deltametrina; Intervet Portugal), que estava larga e pouco contactava com a região cutânea. Afirmaram também que este se encontrava vacinado com LetiFend®, vacina de proteína Q contra LCan, (laboratórios Leti), embora ao analisar o seu boletim sanitário se verificasse um curtíssimo período, cerca de 2-3 semanas, sem hipotética eficácia vacinal (atraso no reforço ou revacinação). Estava alerta, bem disposto, pesava 41,7 Kg e tinha 39,2°C de temperatura. Não apresentava quaisquer outras alterações ao exame físico, à exceção de um aumento ligeiro dos linfonodos poplíteos e recorrente epistaxe, que foi esta última o motivo da consulta.

#### **2.1.5. Diagnósticos diferenciais**

Atendendo à epistaxe, consideraram-se doenças a nível nasal, coagulopatias e outras complicações relacionadas.

A nível nasal excluímos o traumatismo físico, uma vez que o animal não apresentava qualquer lesão observável ao exame físico. Surge também em situações neoplásicas (incluindo adenocarcinoma, condrossarcoma, fibrossarcoma e hemangiossarcoma), embora não se tenham observado quaisquer sinais que o sugerissem. Não se encontrou qualquer fístula oronasal ou abscesso dentário, excluindo doença dentária. No entanto, era também possível uma situação infecciosa: vírica, fúngica, parasitária ou bacteriana (incluindo por *Mycoplasma spp.*).

Quanto ao carácter inflamatório, não seria muito provável estar perante um caso de rinite alérgica ou linfoplasmocitária, dada a altura do ano e a ausência de outros sinais clínicos relevantes.

Coagulopatias como deficiências nos fatores de coagulação ou alterações a nível plaquetário justificariam facilmente a epistaxe, mas seria necessária a realização de exames complementares. Devia-se ainda procurar qualquer afeção relacionada com hiperlipidemia, hipertensão ou tromboembolismo.

Estabelecido o problema, as possíveis origens, não ignorando o facto de o Black Jack viver numa área em que algumas hemoparasitoses são endémicas, deveria considerar a sua pesquisa e avaliar os parâmetros hematológicos do animal.

### 2.1.6. Exames complementares

No primeiro contacto com o caso e definidos os diagnósticos diferenciais, realizámos um hemograma com resultados compatíveis com os parâmetros considerados normais (intervalo de referência), incluindo o hemograma com avaliação plaquetária. Enviou-se material para serologia, pesquisa de hemoparasitas por IFI, observando-se resultados positivos para todas as diluições de *R. conorii* e *L. infantum* (Tabela 5). Enquanto se aguardavam os resultados da serologia, ponderou-se fazer rinoscopia, caso estas análises voltassem negativas, que se revelou desnecessária.

Tabela 5 - Resultados da pesquisa de hemoparasitas por IFI.

Serologia	Títulações	07-09-2017		Valores de Referência
Anticorpos Anti- <i>Rickettsia</i> <i>Conorii</i> IgG	1/64	Positivo		Valorização dos títulos > 1/64
	1/128	Positivo		
Anticorpos Anti- <i>Babesia</i> <i>canis</i> IgG	1/32	Negativo		Valorização dos títulos > 1/32
Anticorpos Anti- <i>Ehrlichia</i> <i>canis</i> IgG	1/40	Negativo		Valorização dos títulos > 1/40

Serologia	Títulações	07-09-2017	19-10-2017	Valores de Referência
Anticorpos Anti- <i>Leishmania</i> <i>infantum</i>	1/80	Positivo	Positivo	Valorização dos títulos > 1/80
	1/160	Positivo	Positivo	
	1/320	Positivo	Positivo	
	1/640	Positivo	Positivo	

Confirmada a seropositividade a *L. infantum* em laboratório, comunicámos ao tutor e agendámos recolha de sangue para um perfil bioquímico (Anexo I – Tabela 24) onde verificámos uma afeção renal com elevados níveis de ureia (mg/dl), proteínas totais (g/dl) e creatinina (mg/dl).

### 2.1.7. Diagnóstico

Com esta informação pudemos já pressupor o estadiamento da doença como estágio IV de leishmaniose de canina (LCan) associada a IRC no estágio 3 da International Renal Interest

Society (IRIS). Aconselhamos nova avaliação renal em alguns dias, com análise de urina tipo II e rácio proteína/creatinina na urina (UP/C), pelo que o tutor optou por procurar uma segunda opinião.

### **2.1.8. Tratamento**

Na primeira consulta do Black Jack, com epistaxe, administramos localmente duas seringas de 3 ml cada com epinefrina SOS (1 mg/ml) e recomendámos ao tutor a aplicação de gelo local para controlar a hemorragia.

Após observarmos alterações renais e definirmos o estágio da LCan iniciamos o tratamento com Leisguard® (domperidona; Esteve; 1 ml/10 kg/PO/SID, durante 4 semanas), Zyloric® 300 mg (alopurinol; laboratórios vitória, SA; 10 mg/kg/PO/12-12h, por um período igual ou superior a 6 meses) e Ronaxan® 100 mg (doxiciclina, Merial Portuguesa – Saúde Animal; 10 mg/kg/PO/SID, durante 28 dias), evitando de momento o Milteforan® (miltefosina; Virbac) dada a sua condição renal. A decisão da administração de doxiciclina, ideal no tratamento de hemoparasitoses, deveu-se ao resultado de IFI positivo de ambas as diluições para anticorpos anti-*Rickettsia conorii*.

### **2.1.9. Acompanhamento**

Aquando do diagnóstico de leishmaniose, os tutores do Black Jack acharam conveniente consultar outro médico veterinário para uma segunda opinião, que reajustou a medicação anteriormente descrita, para Ronaxan® 100 mg (10 mg/kg/PO/SID, durante 28 dias), Zyloric® 300 mg (10 mg/kg/PO a cada 12h, durante 6 meses), Glucantime® 300 mg/ml (antimoniato de n-metilglucamina; Merial Portuguesa – Saúde Animal; 3 injeções a cada 2 dias) e sais de ENO digestivo (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e ácido cítrico; laboratório Glaxo Smith Kline; 1 saqueta dissolvida em água) para controlar o vómito. No entanto, dias após o sucedido, o Black Jack voltou ao HVR com queixa de dor na coxa direita, com anorexia, fezes amareladas, prostrado e com vómitos. Repetiram-se as análises bioquímicas (Anexos I – Tabela 24) e ionograma (Anexos I – Tabela 26), observando-se acidose metabólica e um agravamento da IR, com valores aumentados de creatinina e fósforo, associados a uma baixa albumina. Admitiu-se de imediato o animal no internamento do hospital e dado o seu estágio de IRC iniciou-se a administração de: Lactato de Ringer® (cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio e

lactato de sódio; Braun Vet) para corrigir a desidratação e a ligeira acidose metabólica; Bupaq® Multidose 0,3 mg/ml (buprenorfina; fabricante: Richter Pharma AG; 0,3 ml/10kg/IV/BID); Vomend® 5 mg/ml (metoclopramida; Eurovet Animal Health BV; 0,5 mg/kg/SC a cada 6 h) com função anti-emética; e alimento industrial renal (Hill's™ prescription diet k/d canine, húmida e seca). Enquanto internado, realizou-se uma ecografia abdominal (Anexos I -Tabela 27), aproveitando-se da mesma para colher urina para análise de tipo II com cultura e rácio UP/C.

À ecografia observaram-se alterações (descritas em Anexos I – Tabela 27) a nível da vesícula biliar, rins e próstata. Nas análises à urina verificou-se ligeira hiperestenúria e proteinúria, na medida que a cultura bacteriológica de aeróbios deu negativa.

No dia 27 de setembro o Black Jack teve alta médica com a seguinte prescrição: Omeprazol Generis® 40 mg (omeprazol; fabricante: Generis; 1 mg/kg/PO/SID, em jejum, durante pelo menos 21 dias), Cytotec® 0,2 mg (misoprostol; laboratórios Pfizer; 1 comprimido, PO, a cada 12 h, em jejum, durante 26 dias, utilizando luvas), Ronaxan® 100 mg (5 mg/kg/PO, com alimento, a cada 12 h, durante 21 dias), Milteforan® (2 mg/kg/PO/SID, durante 28 dias e utilizando luvas), Leisguard® (1 ml/10kg/PO/SID, durante 4 semanas), Zyloric® 300 mg (10 mg/kg/PO a cada 12 h, durante 6 meses) + Ipakitine® (lactose, carbonato de cálcio e quitosana; Vetoquinol; uma colher de 8 gramas à refeição, duas vezes ao dia), fluidoterapia com Lactato de Ringer® (1 L/SC/SID) e dieta renal, comercial ou caseira.

Na reavaliação seguinte, a 2 de outubro de 2017, o animal apresentou aumento de peso, com dieta caseira (peito de frango/perú com arroz/massa/batata), sem vômitos e com fezes normais, mas os tutores revelaram existência de urina espumosa, repetindo-se uma ecografia de controlo (Anexo I – Tabela 27) e restantes exames complementares para um cão com leishmaniose. Os seus valores de creatinina tinham melhorado, embora a ureia, o fósforo, o rácio UP/C e o proteinograma (Anexo I – Tabela 28 e Figura 29) estivessem piores. Com uma proteinúria de 1,1 e uma gamopatia policlonal compatível com síndrome nefrótica, decidiu admitir-se o Black Jack para internamento de dois dias, mantendo a prescrição anterior. No dia 4 de outubro, embora o Black Jack se encontrasse bastante alerta e com melhoria dos valores renais, apresentava vômitos e alguma hematuria (por prostatite diagnosticada na ecografia), teve alta clínica com a seguinte prescrição: Alsir® 50 mg/ml (enrofloxacina; Esteve; 5mg/kg/SC/SID, durante 5 dias), Vomend® 5 mg/ml (0,5 mg/kg/SC a cada 6 h) e Lactato de Ringer® (1 L/SC/SID). A 11 de outubro durante uma reavaliação os tutores referiram que embora o animal se apresentasse bem-disposto, tinha relutância em alimentar-se, tendo sofrido

algumas variações de peso corporal. Prescreveu-se Mirtazapina ratiopharm® 15 mg (mirtazapina; Ratiopharm; 0,7 mg/kg/PO/SID durante 4 dias) numa tentativa de estimular o apetite, tendo tido uma resposta positiva. Alguns dias depois, e dado o seu quadro laboratorial satisfatório, cessou o tratamento de Ronaxan® e Mirtazapina® e iniciou um tratamento com Fortekor® Sabor 20 mg (cloridrato de benazepril; Novartis; ½ comprimido por dia, PO) para a IRC.

Na última reavaliação em que contactei com o Black Jack, no final de dezembro de 2017, o animal tinha-se mantido clinicamente estável, com o rácio UP/C e proteinograma estabilizados, com melhorias nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e ionograma, sem vômitos, tinha ganho peso corporal e apresentava um apetite normal.

## 2.2. Caso clínico nº 2

### 2.2.1. Identificação

<b>Nome</b>	<b>Bolacha</b>
<b>Data de nascimento</b>	23-outubro-2010
<b>Espécie</b>	Canina
<b>Raça</b>	Golden Retriever
<b>Sexo</b>	Macho
<b>Pelagem</b>	Curta, de cor creme

### 2.2.2. História pregressa

O Bolacha é um cão seropositivo para *Leishmania*, diagnosticado em junho de 2017, com sinais de envolvimento renal. A tutora referiu que aquando do diagnóstico foi tratado com Milteforan® durante 28 dias.

### 2.2.3. Motivo da consulta

O motivo da consulta que levou o Bolacha no dia 16 de novembro de 2017 ao HVR, foi a queixa de hiporexia, apetite caprichoso e alterações a nível do pelo.

### 2.2.4. Anamnese e exame físico

Em termos gerais parecia bem em casa mas estava a perder peso e tinha uma lesão de pele no membro anterior direito (MAD). Inicialmente comia alimento industrial, seco, mas agora já só come com a ajuda de arroz. No dia anterior a tutora viu-o a comer terra, e relatava que o Bolacha por vezes emitia fezes moles mas estava sem vômitos. Era um cão que vivia dentro de casa e tinha acesso livre a espaço no exterior. Ao exame físico mostrava-se prostrado, com baixa condição corporal (pontuação 2 em 5), estava com 20,45 kg, a sua pele e pelo no geral em mau estado, sem brilho, e observava-se uma lesão no antebraço direito com alguma extensão, mas que não aparentava ser pioderma. A sua temperatura corporal era de 38,1°C, dentro do intervalo de referência para a espécie e na inspeção da cavidade oral tinha halitose.

Sem dor ou alterações evidentes à palpação abdominal e os linfonodos periféricos estavam normais. Efetuou-se um exame dermatológico com os resultados apresentados na Tabela 6:

Tabela 6 - Resultado do exame dermatológico.

<b>Observação à distância</b>	Pelo sem brilho por todo o corpo e zonas de hipotricose, nomeadamente no MAD.
<b>Prova de arrancamento de pelo</b>	Depilação facilitada no MAD.
<b>Avaliação da espessura e elasticidade da pele</b>	Pele com algum espessamento e perda de elasticidade generalizada.
<b>Alterações nas zonas afetadas</b>	Descamação no MAD.

### 2.2.5. Diagnósticos diferenciais

Segundo a história clínica e exame físico, consideram-se os seguintes diagnósticos diferenciais: doença infecciosa (mais concretamente, leishmaniose canina), IR ou glomerulonefrite, doença gastrointestinal, doença imunomediada (lúpus eritematoso sistémico – LES) e endócrina (hipotireoidismo, hiperadrenocorticismo ou doença de Cushing).

A LCan, infeção recidiva ou recorrente, era a única que podia explicar todos os sinais clínicos registados ao exame físico e anamnese, apesar de não se observar adenomegalia periférica. A IR ou glomerulonefrite, causada pela LCan podia de igual forma explicar o seu estado mental, a hiporexia, a perda de peso, o estado do pelo e a halitose. As fezes moles e a perda de peso podem muitas vezes ser causadas por alterações a nível do trato gastrointestinal. O mau estado do pelo por todo o corpo e a lesão dermatológica no membro podiam estar associados a infeções dermatológicas, que muitas vezes são concomitantes. Nas doenças endócrinas, verificam-se igualmente vários sinais clínicos descritos pela tutora do Bolacha, embora não seja muito provável, dada a sua história clínica.

### 2.2.6. Exames complementares

Para apurar a causa destes sinais e tomar uma opção terapêutica, realizaram-se vários exames durante a consulta no HVR, tais como: perfil hematológico, bioquímica sérica,

ionograma, ecografia abdominal, radiografia abdominal, análise de urina tipo II com cistocentese e teste Leiscan® (ELISA). Uma vez que a tutora não referiu observação de comportamento prurítico, confirmou-se a ausência de prurido por tricograma, com as extremidades intactas. Uma raspagem de pele foi também realizada para descartar infecções parasitárias de pele (por exemplo demodicose) e deu negativa.

Enquanto no hemograma não se observaram alterações relevantes, na análise bioquímica o Bolacha apresentava hipoalbuminemia (1,9 g/dl), hiperfosfatemia (13,9 mg/dl), creatinina elevada (9,7 mg/dl) e ureia superior ao valor sustentado pelo aparelho de análise laboratorial (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultado das bioquímicas no soro.

Descrição	16-11-2017	Valores de Referência
<b>ALP (UI/L)</b>	93	<130
<b>Glucose (mg/dL)</b>	106	72-122
<b>Albumina (g/dL)</b>	1,9	2,2-3,5
<b>Ureia (mg/dL)</b>	>200	6-25
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	9,7	<2
<b>Proteínas Totais (g/dL)</b>	5,6	4,7-6,9
<b>Fósforo (mg/dL)</b>	13,9	2,5-5,6

Alguns valores estavam alterados no ionograma (Anexo II – Tabela 31) realizado durante a consulta, com tendência para uma ligeira acidez metabólica e anemia grave (hematócrito de 4,9 %). Na ecografia observou-se um quisto no rim esquerdo, com curvatura medular hiper Marcada bilateralmente e imagem bastante alterada no trato gastrointestinal com muito gás e sombra acústica. A radiografia abdominal obtida não permitiu observar lesões relevantes ao diagnóstico.

O Bolacha, através da urina analisada (Anexo II – Tabela 32) encontrava-se hiperestenúrico (1,020), proteinúrico (4+) e com hematúria (2+). Que após conversar com a tutora se ponderou a realização o teste de leptospirose por microaglutinação que deu negativo, ao contrário do ELISA para *Leishmania*.

### 2.2.7. Diagnóstico

O Bolacha está infetado com LCan no estágio IV, muito grave, associado a um quadro de anemia e IRC no estágio 4 da IRIS, com risco de agravamento dos sinais clínicos sistêmicos e crise urêmica. O seu prognóstico é muito reservado.

### 2.2.8. Tratamento

No dia da consulta houve indicação para internamento hospitalar com fluidoterapia, Lactato de Ringer® (90 ml/kg/h) e administração de Zyloric® (10 mg/kg/PO a cada 12 h), enquadrado no tratamento da LCan estágio IV. Embora a sua albumina estivesse baixa, não se procedeu a transfusão de plasma e Bolacha continuava bastante prostrado rejeitando o alimento húmido oferecido (Hill's™ prescription diet canine k/d). Deste modo, após conversar com os tutores colocou-se um cateter central e fez-se uma sessão de hemodiálise no HVR, monitorizando o Bolacha ao longo do procedimento.

### 2.2.9. Acompanhamento

Como no final da hemodiálise o animal ficou muito prostrado, hipertenso e com taquicardia ventricular ao eletrocardiograma (ECG), requisitou-se novo ECG e ecocardiografia. Ao eletrocardiograma observamos complexos ventriculares prematuros esporádicos, com origem no ventrículo direito e sem comprometimento hemodinâmico, que em conjunto com o observado na ecocardiografia (Tabela 8) nos indicam a presença de miocardite.

Tabela 8 - Relatório de ecocardiografia

#### Descrição

- Hipertrofia moderada do ventrículo esquerdo (VE), mais da parede lateral do VE;
- Funções sistólica e diastólica normais;
- Rácio AE/AO de 1,2 (normal);
- Ligeira regurgitação mitral;
- Fluxo pulmonar turbulento com velocidade de 2,5 mm/s ligeira.

Segundo este quadro cardíaco, não necessitaria de indicação terapêutica, uma vez que a hipertrofia do ventrículo esquerdo poderia ser secundária a hipertensão sistémica e favorecer a miocardite. No entanto, recomendou-se a medição de troponinas séricas para diagnosticar lesão

cardíaca, que os tutores recursaram. Sem reversão possível e após conversar com os tutores do Bolacha, determinou-se seguir com eutanásia ao final do dia 19 de novembro.

## 2.3. Caso clínico nº 3

### 2.3.1. Identificação

<b>Nome</b>	<b>Gil</b>
<b>Data de nascimento</b>	15-agosto-2013
<b>Espécie</b>	Canina
<b>Raça</b>	Podengo português
<b>Sexo</b>	Macho
<b>Pelagem</b>	Cerdosa, de cor amarela

### 2.3.2. História pregressa

O Gil é um cão diagnosticado com leishmaniose recentemente em outro centro de atendimento médico-veterinário (CAMV), sem qualquer referência a condições patológicas anteriores, segundo o tutor.



Figura 15 - Gil no internamento do HVR, durante o exame físico da manhã (fotografia de Catarina Cerqueira).

### 2.3.3. Motivo da consulta

Consulta de referência no HVR no dia 13 de outubro de 2017, por motivo de seropositividade a *Leishmania*.

### 2.3.4. Anamnese e exame físico

O Gil era um animal de quinta, que tinha sido vacinado pela última vez contra a leptospirose, com Nobivac® L4 (4 estirpes inativadas, de *Leptospira interrogans*, *L. kirschneri*; Nobivac) há menos de 1 ano, com historial de carraças no passado e elevado contacto com ratazanas e coelhos. Com avaliação analítica realizada no CAMV anterior compatível com

IR/glomerulonefrite, anemia, anorexia, alguma atrofia muscular (avaliação de condição corporal baixa), pelo sem brilho, ligeiramente prostrado e linfadenomegalia superficial (Figuras 15 e 16). No momento da consulta o Gil estava prostrado, magro, com 6,35 kg, pontuação de condição corporal de 2 em 5, temperatura de 37,8°C (dentro dos valores de referência) e com ligeira adenomegalia generalizada. Os tutores referiram que o Gil não tinha apetite, havia vomitado nos dias anteriores, apresentava as mucosas pálidas (Figura 9), com uma ligeira desidratação (aproximadamente 5 %) à prega de pele e halitose.

### **2.3.5. Diagnósticos diferenciais**

Segundo a história atual e exame físico, podemos estabelecer os seguintes diagnósticos diferenciais: doença infecciosa (leishmaniose, leptospirose e babesiose), estágio avançado de doença renal, glomerulonefrite e intoxicação. A IRC é um sinal clínico frequente de LCan, podendo causar todos os sinais observados no exame físico. A leptospirose está intimamente relacionada com o contacto com roedores e más condições de higiene, assim como a intoxicação por ingestão de compostos químicos.



Figura 16 - Observação de características externas, pelo, condição corporal e estado mental, do Gil durante o internamento (fotografia de Catarina Cerqueira).

### **2.3.6. Exames complementares**

Abordou-se o tutor do Gil num possível plano clínico com repetição de valores pré-admissão, avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos, ionograma, ecografia abdominal e análise de urina tipo II com urocultura. No que diz respeito a doenças infecciosas,

embora tenhamos a confirmação da LCan, realizou-se detecção de outras doenças causadas por agentes transmitidos por vetores por esfregaço sanguíneo.

No hemograma observamos uma suave leucopenia com uma suave anemia, normocítica e normocrômica (Anexo III – Tabela 34). Na análise bioquímica do soro, o Gil tinha uma azotemia renal grave, aumento dos valores de creatinina e hipoalbuminemia, como apresentado na seguinte tabela:

Tabela 9 - Resultados da análise bioquímica.

Descrição	Resultados	Valores de Referência
Albumina (g/dL)	1,4	2,2-3,5
Ureia (mg/dL)	119	6-25
Creatinina (mg/dL)	3,7	<2

Observaram-se algumas alterações nos parâmetros do ionograma sérico (Anexo III – Tabela 37), com destaque na hipocalcemia e anemia. Na ecografia abdominal verificou-se um quadro muito sugestivo de nefrite/glomerulonefrite marcada associado a urêmica gastrointestinal (Anexo III – Tabela 38). Na análise à urina esta estava hiperestenúrica e com proteinúria (Anexo III – Tabela 39), negativa na cultura de aeróbios.

O esfregaço sanguíneo (Anexo III – Tabela 40) foi realizado 4 dias após a consulta, não se identificando formas evidentes de hemoparasitas, mas confirmou os resultados anteriormente obtidos (presença e classificação morfológica da anemia e leucopenia). No momento, não se considerou vital a pesquisa de hemoparasitas por serologia ou PCR.

### 2.3.7. Diagnóstico

Conforme os resultados apresentados, o Gil tinha complicações sistêmicas associadas a LCan no estágio IV. A IR do Gil estava no estágio 3, pela IRIS e tinha resultados sugestivos de nefrite/glomerulonefrite grave com urêmica gastrointestinal, anemia e alguma caquexia. O seu prognóstico é reservado.

### 2.3.8. Tratamento

Durante a primeira consulta, e dado o estado geral do Gil, determinou-se o internamento durante cerca de 1 mês, com: alimentação forçada de Hill's™ Prescription Diet k/d canine, húmida e seca; Lactato de Ringer® (100 mg/kg/h/IV); medicação para leishmaniose e para

outras complicações associadas: Omeprazol Genéris® 10 mg (1 mg/kg/PO/SID, em jejum), Milteforan® (2 mg/kg/PO/SID), Zyloric® 100 mg (10 mg/kg/PO a cada 12 h) e Ipakitine® (2 colheres no alimento, TID). Manteve-se hipertenso após correção da hidratação, iniciando Fortekor® 5 mg (1 comprimido por dia, PO) que não resolveu, tendo-se de associar Amodip® 1,25 mg (amlodipina; Ceva; ¼ de comprimido por dia, PO). Embora o Amodip® seja um medicamento licenciado para gatos, demonstrou-se útil no tratamento da hipertensão arterial em cães, evitando aumentar a dose do IECA (inibidor da enzima de conversão da angiotensina), Fortekor®, e agravar os valores renais do Gil. Ponderou-se transfusão e hemodiálise, mas os tutores não acharam conveniente no momento.

### **2.3.9. Acompanhamento**

Durante o processo de internamento realizou-se repetição do painel renal a cada 24-48 h e monitorização clínica com alimentação forçada. Ao longo do tratamento o Gil ganhou apetite, com vômitos esporádicos nos primeiros dias e fezes moles. Cerca de uma semana após o internamento, realizou-se nova ecografia de controlo (Anexo III – Tabela 38) com presença de líquido livre anecogénico, generalizado, em quantidade moderada, compatível com hipoalbuminemia com transudado. Associado a doença infecciosa observou-se esplenomegalia, linfadenomegalia e possível nefrite/glomerulonefrite. Nas alterações gástricas denotamos uma gastrite urémica que sugere inflamação ou neoplasia da parede, devendo este dado ser vigiado, pois pode ser apenas do alimento e ser um caso transitório.

O Gil teve alta no dia 20 de outubro com prescrição de administrações diárias de Lactato de Ringer® (250 ml, SC), Omeprazol Genéris® 10 mg (1mg/kg/PO/SID, em jejum, durante 8 dias), Milteforan® (2 mg/kg/PO/SID, com alimento e utilizando sempre luvas), Zyloric® 100 mg (10 mg/kg/PO a cada 12 h), Amodip® 1,25 mg (¼ de comprimido por dia, PO), Fortekor® 5 mg (1 comprimido por dia, PO) e Ipakitine® (2 colheres no alimento, TID).

Nas seguintes consultas de reavaliação no HVR o Gil encontrava-se moderadamente estável, ainda com vômitos devido à gastrite urémica observada nas ecografias e hipertensão. À ecografia, observam-se lesões esplénicas que podem ter sido provocadas pela administração do Milteforan®. No dia 31 de outubro, em consulta de reavaliação, dada a sua hipertensão e rácio UP/C elevado de 8, determinou-se manter o Milteforan® até perfazer os 30 dias, continuar as administrações diárias de soro SC, assim como toda a medicação anteriormente prescrita. Para o problema gástrico, adicionou-se ao tratamento Cytotec® 0,2 mg (¼ de comprimido, PO,

a cada 24 h, em jejum e utilizando luvas) e Cerenia® 16mg (citrato de maropitant; Zoetis; 2mg/kg/PO/SID, em jejum, durante 4 dias).

## 2.4. Caso clínico nº 4

### 2.4.1. Identificação

<b>Nome</b>	<b>Happy</b>
<b>Data de nascimento</b>	30-março-2014
<b>Espécie</b>	Canina
<b>Raça</b>	Cocker Spaniel
<b>Sexo</b>	Macho
<b>Pelagem</b>	Média, de cor dourada

### 2.4.2. História pregressa

Em 2015 teve um episódio de intoxicação por contacto com lagarta-do-pinheiro, igualmente conhecida como processionária. Também no mesmo ano teve uma úlcera de córnea no olho direito (OD) para a qual fez tratamento médico, inclusive soro autólogo. É usual a utilização de soro autólogo em situações de queratoconjuntivite seca (QCS) e úlceras de córnea, diminuindo a probabilidade de contaminações bacterianas. Consiste em um colírio obtido através do plasma do próprio animal, rico em plaquetas, enriquecido com fatores de crescimento e com elevada capacidade na regeneração de tecidos. O Happy está diagnosticado com LCan desde janeiro de 2016, motivado por um quadro cutâneo que se pensou ser um fungo.

### 2.4.3. Motivo da consulta

Apresentou-se à consulta de Oftalmologia no HVR no dia 17 de setembro de 2017 para reavaliação das complicações oculares recorrentes e monitorizar a LCan.

### 2.4.4. Anamnese e exame físico

Dado o seu diagnóstico de LCan fez tratamento com Glucantime® 300 mg/ml (em fevereiro de 2016) e no momento da consulta no HVR está apenas com Zyloric® 300 mg. Tem quadros de inflamação recorrente no OD e está medicado com Homatrocil® 1 mg/ml (dexametasona; VAPP; 1 gota TID durante uma semana), Vidisic® gel 2 mg/ml (carbómero 980 – ácido poliacrílico; Bausch & Lomb; 1 gota TID durante 1 semana) e um preparado que

faz parte de um teste experimental da FMV que a tutora não soube explicar. Esta revelou ainda que o Happy tinha um problema cardíaco e tomava Cardisure® Flavoured 1,25 mg (pimobendam; Dechra; 0,5 mg/kg/PO/BID). Na consulta o Happy não apresentou alterações relevantes no exame de estado geral. Era um cão que vivia dentro de casa e tinha um pelo bastante sedoso, uma boa pontuação de condição corporal (3 em 5), com apetite normal, pesava cerca de 17,1 kg e os linfonodos encontravam-se nas dimensões consideradas normais. A sua temperatura corporal encontrava-se dentro dos valores de referência para a espécie, estava alerta e consciente.

A tabela seguinte (Tabela 10) diz respeito ao exame oftalmológico realizado a 17 de setembro no HVR:

Tabela 10 - Resultados do exame oftalmológico.

<b>Exame</b>	<b>Olho direito (OD)</b>	<b>Olho esquerdo (OS)</b>
<b>Teste de Schirmer</b>	21 mm/min	21 mm/min
<b>Teste de fluoresceína</b>	Normal	Normal
<b>Reflexos oculares</b>	Presentes	Presentes
<b>Exame neurooftalmológico</b>	Normal	Normal
<b>Teste de fluoresceína</b>	Normal	Normal
<b>Teste de rosa de bengala</b>	Negativo	Não aplicável
<b>Pressão intra-ocular (PIO)</b>	10 mmHg	12 mmHg
<b>Segmento anterior</b>	Sem alterações	Normal
<b>Segmento posterior</b>	Na zona paracentral ventral observa-se com contorno em forma de pêra, com 7 mm no eixo maior, distrofia do cristalino. Provavelmente de origem lipídica, com vários cristais depositados na zona estromal anterior.	Normal
<b>Fundo do olho</b>	Normal	Normal
<b>Anexos oculares</b>	Hiperémia 1+ na conjuntiva bulbar	Normal

#### 2.4.5. Diagnósticos diferenciais

Perante a queixa clínica e posterior exame físico e oftalmológico, consideramos os seguintes diagnósticos diferenciais: conjuntivite e episclerite causada por agentes químicos, problema imuno-mediado, traumático, infeccioso/sistémico (por exemplo: leishmaniose, hepatozoonose e listeriose) ou neoplasia.

#### 2.4.6. Exames complementares

Dado o historial clínico do animal fez-se teste Leiscan® e decidiu-se realizar citologia conjuntival para caracterizar a inflamação presente e, dado o diagnóstico de LCan, realizar PCR conjuntival de *Leishmania* spp. Pelo método serológico, ELISA (Tabela 11) o resultado de LCan foi positivo muito alto, *i.e.* 1/640 a 1/1280, enquanto no diagnóstico molecular, PCR da conjuntiva, não foi detetado ADN de *Leishmania* na amostra enviada (Tabela 12).

Tabela 11 - Resultado do Leiscan® (ELISA).

Ensaio	Resultado
<i>Leishmania-Ac</i>	3,58

Tabela 12 - Resultado do PCR conjuntival.

Análise	Resultado
RT-PCR <i>Leishmania infantum</i>	Negativo

A citologia conjuntival por zaragatoa (Tabela 13), corada com Diff-Quick, permitiu observar uma hiperplasia inespecífica, descrita no quadro seguinte:

Tabela 13 – Resultados da citologia conjuntival do Happy.

Descrição	Conclusões
Na amostra observam-se muitas células epiteliais organizadas isoladamente ou em pequenos grupos coesivos, com aumento da relação núcleo:citoplasma e rara binucleação. Observou-se também a presença de células pigmentares.	Imagem citológica compatível com hiperplasia inespecífica.

#### **2.4.7. Diagnóstico**

Apesar de o historial clínico bem como a medicação prescrita indicar um quadro de conjuntivite alérgica, a medicação que o Happy estava a receber não permitia avaliar lesões que indicassem um processo inflamatório em curso, provavelmente devido à administração recente de corticosteroides.

A distrofia cristalina verificada ao exame oftalmológico era provavelmente de etiologia primária, mas não se excluiu a possibilidade de ser secundária a um processo inflamatório anterior (queratite, úlcera de córnea). Na maior parte dos casos a distrofia cristalina é inocente, mas pode, por vezes, ser causa de reação inflamatória.

O Happy tem infeção por LCan, provavelmente em estágio II, por ELISA e, embora não tenham sido encontrados parasitas no esfregaço conjuntival, não significa que a lesão ocular não seja provocada por esta infeção.

#### **2.4.8. Tratamento**

Continuou-se o tratamento com Zyloric® para a LCan e Visdisic®, interrompendo a administração de Homatrocil® para ser possível avaliar as lesões associadas ao processo inflamatório no OD. O teste clínico que está a ser realizado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa manteve-se, apesar das queixas oculares do Happy.

#### **2.4.9. Acompanhamento**

No dia 28 de setembro veio à consulta de reavaliação, em que a tutora referiu que o Happy comia bem (Purina® Pro Plan Medium Adult Sensitive Skin OptiDerma de salmão, alimento seco), não tinha perdido peso, apresentava pouca sede, urina e fezes normais e não tinha tosse. Continuava com o tratamento de Zyloric® e Cardisure®. Não se verificaram alterações ao exame físico, o hemograma e bioquímicas não apresentavam nenhum parâmetro alterado (Anexo IV – Tabelas 41 e 42) e realizou-se recolha de urina para análise de urina tipo II, com cultura, rácio UP/C e eletroforese de proteínas totais. Observou-se uma urina (Anexo IV – Tabela 43) de aspeto turvo, com depósito evidente, alcalina, de densidade normal, com proteinúria (2+), lipúria (2+) e cristais de estruvite (3+), típicos de urinas alcalinas. A sua cultura respetiva teve resultado negativo e o rácio UP/C (Anexo IV – Tabela 44) indicava

suspeita de proteinúria enquanto que na eletroforese se observou uma gamopatia policlonal (Figura 17):

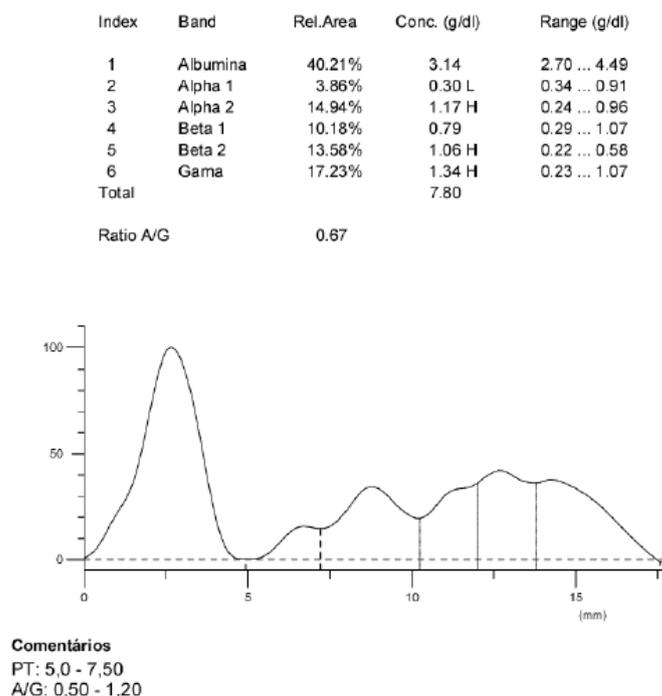


Figura 17 - Resultados da eletroforese de proteínas.

No início do mês de outubro o Happy repetiu os exames para reavaliar a doença, onde se observou um rácio UP/C de 0,3, sem pico de gamaglobulinas, embora discretamente aumentadas. No entanto, uma vez que o hemograma e as bioquímicas se encontravam sem alterações, não houve indicação para instituir novamente o Glucantime®. Foi aconselhado a administração de Leisguard® durante o mês de outubro com repetição a cada 4 meses (3 vezes ao ano), juntamente com o Zyloric®, assim como a repetição da avaliação oftalmológica, serológica e a eletroforese de proteínas totais a cada 2 meses.

A 24 de outubro o Happy apresentou-se à consulta, em que o avaliei pela última vez, para a vacinação anual de DHPPi+L (contra a esgana/cinomose, hepatite infecciosa, parvovirose, parainfluenza e leptospirose canina; laboratórios Novibac®). Ao exame físico detetou-se que mantinha a lesão ocular descrita anteriormente, sem evolução, embora se apresentasse confortável ao exame de estado geral e sem qualquer sinal digno de preocupação no exame oftalmológico. Observou-se um fundo do olho sem alterações e os resultados do teste de Schirmer encontravam-se dentro dos parâmetros considerados normais (20 mm/min no OD e 16 mm/min no OS). Perante os resultados da urina colhida para análise no fim de setembro,

houve preocupação suficiente para se recomendar ecografia abdominal e eventual alteração de dieta. Na ecografia abdominal (Anexo IV - Tabela 45) viu-se com alterações: a bexiga, com bastante sedimento e cristalúria; ambos os rins com aumento da ecogenicidade medular, calcificação dos recessos piélicos com sombreamento acústico e ausência de litíase; e muito sedimento na vesícula biliar. Aconselhou-se alteração de dieta durante um período mínimo de 3 meses com posterior reavaliação. A dieta recomendada foi o alimento comercial Royal Canin® Urinary s/o para cão.

Em janeiro de 2018, soube que o Happy se encontrava estável, bastante alerta, com apetite e a fazer dieta urinária. A inflamação do OD não tinha voltado a verificar-se.

## 2.5. Caso clínico nº 5

### 2.5.1. Identificação

<b>Nome</b>	<b>Moana</b>
<b>Data de nascimento</b>	01-dezembro-2012
<b>Espécie</b>	Canina
<b>Raça</b>	Rough Collie
<b>Sexo</b>	Fêmea
<b>Pelagem</b>	Média, tricolor

### 2.5.2. História pregressa

A Moana era uma cadela com LCan que foi abandonada pelos tutores anteriores numa associação de animais, na zona de Lisboa.

### 2.5.3. Motivo da consulta

Deu entrada no HVR no dia 6 de setembro de 2017 para uma consulta de medicina interna a pedido da sua madrinha de associação. Com queixa de alterações cutâneas, perda de peso e apetite, ultimamente com vômitos, fezes moles e deprimida. A madrinha tinha o desejo de realizar uma avaliação completa tendo em consideração a LCan e também havia sido seguida em outro CAMV.

### 2.5.4. Anamnese e exame físico

Ao exame de estado geral apresentava seborreia seca por todo o corpo e algumas zonas com alopecia. Encontrava-se em fraca condição nutricional (1,5-2 em 5), bastante magra, com 12,3 kg, ligeiramente desidratada (< 5%), com as mucosas pálidas e história de vômito e fezes de consistência mole. A sua temperatura corporal era de 39,7 °C e tinha os linfonodos poplíteos aumentados.

Segundo as informações que nos foram fornecidas pelo outro CAMV acerca das análises realizadas no mês anterior, a Moana tinha um quadro de hipoalbuminemia associado a diluições positivas acima de 1/320 para LCan e um rácio de UP/C na urina de 1,5.

### 2.5.5. Diagnósticos diferenciais

Após a realização de uma correta anamnese e exame físico, ponderámos alguns diagnósticos diferenciais, para além da LCan. A Moana podia estar com um quadro de IR ou glomerulonefrite, associado muito provavelmente à LCan, com perda de peso e rácio UP/C na urina elevado. Apesar da seborreia e alopecia constituírem lesões características da infeção por *Leishmania*, devemos procurar uma possível infeção dermatológica associada à imunossupressão provocada pela LCan. Um outro possível diagnóstico, menos provável, seria a presença de gastroenteropatia e leishmaniose, explicando os vários sinais clínicos de perda de peso, má digestão e malabsorção de nutrientes, hipoalbuminemia e fezes de consistência mole ou diarreicas.

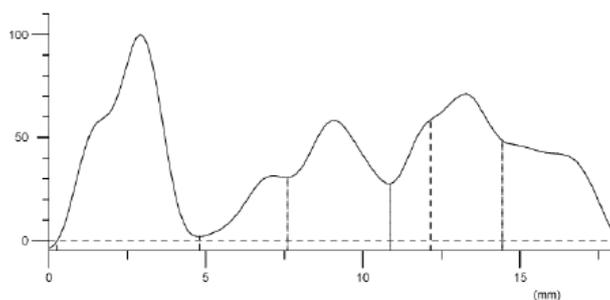
### 2.5.6. Exames complementares

Para avaliar a Moana recolhemos sangue e urina durante a consulta, para realizar o hemograma, a avaliação bioquímica, ecografia abdominal, análise de urina tipo II com cultura e antibiograma, proteinograma e rácio UP/C. Repetiu-se o teste de IFI para confirmação do diagnóstico de LCan na Moana, com títulos positivos. No hemograma (Anexo V – Tabela 46) verificou-se apenas uma elevada leucocitose com neutrofilia e linfopenia, enquanto na análise bioquímica (Anexo V – Tabela 47) a Moana tinha os valores da ALP (fosfatase alcalina) bastante elevada, um quadro de hipoproteinemia e a albumina muito baixa (< 1 g/dl). Na ecografia abdominal observou-se espessamento a nível gástrico e intestinal, além de outras alterações compatíveis com gastroenterite. A urina estava ligeiramente hiperstenúrica e turva, detetando-se presença de *Klebsiella* spp. na cultura de urina (Anexo V – Tabela 48). Observamos ainda uma proteinúria significativa (UP/C > 0,5) associada a uma baixa relação A/G com gamopatia (Tabela 14 e Figura 18, respetivamente):

Tabela 14 - Resultados do rácio UP/C.

<b>Análise</b>	<b>Resultado</b>
<b>Proteínas totais na urina (mg/dl)</b>	67,12
<b>Creatinina na urina (mg/dl)</b>	55,81
<b>Rácio (proteínas totais/creatinina) na urina</b>	1,2

Index	Band	Rel.Area	Conc. (g/dl)	Range (g/dl)
1	Albumina	30.07%	1.26 L	2.70 ... 4.49
2	Alpha 1	6.57%	0.28 L	0.34 ... 0.91
3	Alpha 2	19.08%	0.80	0.24 ... 0.96
4	Beta 1	7.35%	0.31	0.29 ... 1.07
5	Beta 2	19.36%	0.81 H	0.22 ... 0.58
6	Gama	17.57%	0.74	0.23 ... 1.07
Total			4.20	
Ratio A/G		0.43		



Comentários  
PT: 5,0 - 7,50  
A/G: 0,50 - 1,20

Figura 18 – Resultado da eletroforese de proteínas no soro.

### 2.5.7. Diagnóstico

Aquando a primeira consulta da Moana no HVR já sabíamos o seu diagnóstico anterior de LCan, que confirmamos então por IFI. Associada à LCan, no estágio III, apresenta ainda, um quadro de gastroenterite compatível com os sinais clínicos e o observado na ecografia abdominal. Na análise bioquímica verificou-se também a presença de lesões a nível renal, com valores de fosfatase alcalina bastante elevados e a albumina bastante diminuída. Embora os seus parâmetros renais estejam dentro dos valores de referência para a espécie canina, a urina da Moana estava bastante proteinúrica e detetou-se a presença *Klebsiella* spp., com possível infeção, associada a uma grande leucocitose.

### 2.5.8. Tratamento

Na consulta procedeu-se ao internamento da cadela para observação, realização de exames complementares e tratamento sintomático. No HVR iniciou a terapêutica com Lactato de Ringer® (100 mg/kg/h/IV), Glucantime® 300 mg/ml (100 mg/kg//SID/PO durante 20 dias), Zyloric® 100 mg (10 mg/kg/PO de 12-12 h, durante 6 meses) e Fortekor® Sabor 5 mg (1 comprimido por dia, PO) contra a LCan. Adicionou-se ainda Lasa® 10 mg (famotidina; Aristo Pharma Iberia; 0,5 mg/kg/PO de 12-12 h), Purina® ProPlan Veterinary Diets FortiFlora

(bactérias lácticas *Enterococcus faecium* SF68®; Purina®; 1 saqueta por dia no alimento, durante 7 dias) e Alsir 10® 50 mg (5 mg/kg/PO/SID durante 5 dias) para resolver os sinais digestivos e urinário.

### **2.5.9. Acompanhamento**

Cerca de 4 dias após a primeira consulta, no dia 10, a Moana teve alta clínica e foi adotada por uma enfermeira do HVR, continuando a terapêutica iniciada no internamento. Após a resolução dos sinais clínicos de gastroenterite continuou o tratamento para LCan com Glucantime®, Zyloric® e Fortekor®. Atualmente encontra-se estável e tem efetuado as suas reavaliações a cada 4 meses no HVR.

## 2.6. Caso clínico nº 6

### 2.6.1. Identificação

<b>Nome</b>	<b>D. Dinis</b>
<b>Data de nascimento</b>	01-janeiro-2007
<b>Espécie</b>	Felina
<b>Raça</b>	Europeu Comum
<b>Sexo</b>	Macho
<b>Pelagem</b>	Curta, de cor cinzenta

### 2.6.2. História pregressa

Gato adulto com história de parasitas externos e seropositivo para FIV.

### 2.6.3. Motivo da consulta

O D. Dinis veio referenciado de outro CAMV da área metropolitana de Lisboa, apresentando-se no dia 10 de maio de 2017 à consulta no HVR com queixa de alterações oculares recentes e suspeita de cegueira.

### 2.6.4. Anamnese e exame físico

Segundo as informações que obtive na minha pesquisa clínica, o animal, com cerca de 10 anos, havia sido adotado havia pouco tempo, tendo vivido grande parte da sua vida na rua, sem qualquer informação acerca do seu estado sanitário anterior, excetuando a presença de parasitas externos (carraças) aquando a sua adoção. Vivia dentro de portas com um outro gato que apresentava sinais de obesidade e sem qualquer outra complicação conhecida. Segundo as análises gentilmente cedidas pelo CAMV que referenciou o D. Dinis, relativamente às análises de março de 2017, o animal teve uma ligeira anemia normocítica e normocrómica, assim como uma hiperglicemia e proteinemia, possivelmente provocados pelo stresse e existência de infeção, respetivamente. Haviam sido também realizados testes ELISA (Uranotest®) para FeLV e FIV, sendo o resultado da leucemia negativo enquanto o FIV permaneceu positivo, como já esperávamos. No exame de estado geral o D. Dinis apresentava-se dentro do seu estado

normal, em bom estado nutricional, mas tinha perdido peso recentemente. Pesava 5,9 kg no momento da consulta, estava alerta, agressivo na consulta, como é habitual e consciente. O seu pelo estava em bom estado, brilhante, estava hidratado, com a temperatura corporal dentro dos valores de referência e não se observou aparente linfadenomegalia. Sem alterações significativas nos parâmetros vitais e sem qualquer lesão externa visível, no entanto, na inspeção estomatológica observou-se gengivite crónica, mobilidade dentária e presença de placa bacteriana associada a halitose. No entanto, dado o comportamento agressivo do gato, não foi possível uma avaliação oral completa. Ao exame oftalmológico (Tabela 15), o D. Dinis apresentou sinais de opacidade de córnea, associada a uveíte crónica no olho direito (Figura 19), induzida pelo cristalino e com colapso total do mesmo. Estas lesões levavam a suspeita de uveíte facoinduzida crónica predisposta a desenvolvimento de sarcoma lenticular. Observaram-se sinéquias posteriores e invasão lenticular de tecido com neovascularização, concluindo-se que o olho direito, sem existência de glaucoma associado, estava não visual.

Tabela 15 - Resultados registados ao exame oftalmológico do D. Dinis.

<b>Exame</b>	<b>Olho direito (OD)</b>	<b>Olho esquerdo (OS)</b>
<b>Teste de Schirmer</b>	Normal	Normal
<b>Reflexos oculares</b>	Reflexo direto e consensual ausentes. Sem reflexo de encadeamento.	Reflexos normais.
<b>Exame neurooftalmológico</b>	Ausente	Normal
<b>Teste de fluoresceína</b>	Negativo	Negativo
<b>Pressão intra-ocular (PIO)</b>	15 mmHg	19 mmHg
<b>Segmento anterior</b>	Córnea com alguma opacidade.	Normal.
<b>Segmento posterior</b>	Cristalino totalmente colapsado. Uveíte crónica. Sinéquias posteriores com invasão lenticular de tecido e neovascularização.	Fundo do olho normal.
<b>Anexos oculares</b>	Normal	Normal



Figura 19 - Olho direito do D. Dinis onde podemos observar uveíte e formas amastigotas (fotografia gentilmente cedida por Dr. Diogo Magno).

### **2.6.5. Diagnósticos diferenciais**

Perante os sinais clínicos descritos na anamnese e exame físico, podemos apresentar diversos diagnósticos diferenciais: doença congénita, doença do nervo óptico, trauma, neoplasia, exposição a produto tóxico, doença imunomediada, infecciosa (por exemplo: FIV, PIF, toxoplasmose, micoplasmose felina/rickettsiose e leishmaniose felina).

O facto de o D. Dinis ter vivido na rua bem como a sua idade podem explicar os sinais dentários pela má-nutrição, higienização e positividade ao FIV. Gatos com infeção por este lentivírus apresentam também perda de peso e alterações a nível ocular, como a uveíte crónica. Na uveíte crónica é frequente a perda de visão, o desconforto ocular e diminuição de PIO, muitas vezes associada a doença infecciosa. Caso a uveíte seja provocada por trauma, pode ocorrer o colapso do cristalino que associado à uveíte pode, mais tarde, vir a desenvolver sarcoma. Quando existe uma neoplasia ocular é frequente observar-se envolvimento do trato uveal, perda de visão ou luxação da lente. A cegueira observada no OD pode ter origem nalguma doença congénita, doença do nervo ótico, traumatismo e doença infecciosa. A ligeira opacidade na córnea do D. Dinis deverá estar relacionada com infiltrado celular (viral, bacteriano ou fúngico) ou com distrofia genética.

### **2.6.6. Exames complementares**

Na primeira consulta do D. Dinis no HVR, após a realização da anamnese, exame físico e oftalmológico, decidiu-se em conversa com a tutora, avançar para enucleação do OD e consequente exploração da cavidade oral enquanto anestesiado. Nessa consulta e como avaliação pré-cirúrgica, realizaram-se apenas análises aos parâmetros hematológicos e bioquímicos, apresentados nas Tabelas 16 e 17, respetivamente.

Tabela 16 - Resultados do hemograma pré-cirúrgico.

<b>Descrição</b>	<b>Resultados</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>WBC (10<sup>3</sup>/uL)</b>	5,87	5,50 – 19,50
<b>NEU (10<sup>3</sup>/uL)</b>	3,15	3,12 – 12,58
<b>LYM (10<sup>3</sup>/uL)</b>	2,30	0,73-7,86
<b>MON (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0,38	0,07 – 1,36
<b>EOS (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0,04	0,06 – 1,93
<b>BAS (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0,00	0,00 – 0,12
<b>NEU (%)</b>	53,7	38,0 – 80,0
<b>LYM (%)</b>	39,2	12,0 – 45,0
<b>MON (%)</b>	6,4	1,0 – 8,0
<b>EOS (%)</b>	0,7	1,0 – 11,0
<b>BAS (%)</b>	0,0	0,0 – 1,2
<b>RBC (10<sup>6</sup>/uL)</b>	7,07	4,60 – 10,20
<b>HGB (g/dL)</b>	9,7	8,5 – 15,30
<b>HCT (%)</b>	28,5	26,0 – 47,0
<b>MCV (fL)</b>	40,3	38,0 – 54,0
<b>MCH (pg)</b>	13,7	11,80 – 18,0
<b>MCHC (g/dL)</b>	34,1	29,0 – 36,0
<b>RDW-CV (%)</b>	21,3	16,0 – 23,0
<b>RDW-SD (fL)</b>	36,8	26,4 – 43,1
<b>PLT (10<sup>3</sup>/uL)</b>	164	100 – 580
<b>MPV (fL)</b>	13,0	9,9 – 16,3
<b>PDW (10GSD)</b>	15,0	12,0 – 17,5
<b>PCT (%)</b>	0,213	0,090 – 0,700

Tabela 17 - Resultados da análise bioquímica pré-cirúrgica.

<b>Descrição</b>	<b>Resultados</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>ALP (UI/L)</b>	79	0-123
<b>GPT/ALT (UI/L)</b>	31	0-105
<b>Glucose (mg/dL)</b>	111	61-103
<b>Ureia (mg/dL)</b>	20	13-33
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	1,7	0,9-1,9
<b>Proteínas Totais (g/dL)</b>	9,1	5,2-7,7

As análises realizadas estavam na sua maioria dentro dos valores de referência para a espécie felina, excepcionando uma ligeira eosinopenia, hiperglicemia (possivelmente pelo stresse na colheita de sangue) e hiperproteinemia, que poderá estar relacionada a desidratação, processos infecciosos ou inflamatórios.

### 2.6.7. Diagnóstico

Na primeira consulta, perante a anamnese e exames realizados, não foi possível chegar a um diagnóstico conclusivo para o D. Dinis. Segundo história clínica apenas sabemos que o

gato apresentava seropositividade a FIV, tinha inúmeras alterações a nível ocular e dentário. Só foi possível apurar o diagnóstico definitivo nas consultas e intervenções seguintes, que irei abordar mais à frente.

### 2.6.8. Tratamento

Dadas as alterações observadas no olho direito e o estado estomatológico do D. Dinis, após a realização dos exames complementares necessários e em consenso com a tutora, agendou-se a cirurgia de enucleação, seguida de exploração oral, eventual extração dentária e higienização profissional da cavidade oral (HPCO) no dia 15 de maio. Após a enucleação, enviou-se para avaliação histopatológica o globo ocular direito, com 1,7 cm de diâmetro. De seguida, procedeu-se à avaliação da cavidade extraoral, onde não se verificaram alterações relevantes no que diz respeito à face, articulação temporomandibular, glândulas salivares e linfonodos. A avaliação intraoral está descrita na tabela seguinte:

Tabela 18 - Resultados registados na exploração da cavidade intra-oral do D. Dinis.

<b>Descrição</b>	<b>Resultado</b>
<b>Número, tamanho e forma</b>	Normal.
<b>Má-oclusão</b>	Classe 0 (normoclusão)
<b>Gengivite</b>	Grau 3 (inflamação muito inflamada, com eritema, edema e sangramento)
<b>Retração gengival</b>	Ausente
<b>Bolsas periodontais</b>	Presentes, em alguns dentes.
<b>Mobilidade</b>	Grau 2 (mobilidade de 0,5-1,0 mm) Dentes canino mandibular e carniceiro esquerdos.
<b>Perda óssea</b>	Presente. Observam-se lesões de reabsorção odontoclástica felina, estágio 3-4 e possivelmente tipo I (inflamatório).
<b>Cálculo</b>	Presente, em vários dentes.
<b>Placa bacteriana</b>	Presente, em vários dentes.
<b>Halitose</b>	Presente.

Terminada a avaliação oral, decidiu extrair-se os dentes canino mandibular esquerdo (304) e o carniceiro esquerdo (307) (Anexo VI – Figura 23), por método fechado. O D. Dinis estará no estágio inicial de doença periodontal (DPI) e com síndrome de reabsorção

odontoclástica. Em seguida, procedeu-se à HPCO, com o objetivo de minimizar a deposição de placa bacteriana e controlar a gengivite. Aconselhou-se a administração de uma alimentação húmida (Veterinary Diet Recovery, Royal Canin®) durante 24 a 48 horas após a intervenção, um antibiótico, Clavubactin® 50/12,5 mg (amoxicilina e ácido clavulânico; Esteve; 1 comprimido de 12 em 12 horas, PO, durante 7 dias) e um anti-inflamatório não esteroide (AINE), Onsior® 6 mg (robenacoxib; Novartis; 1 comprimido, SID, PO durante 3 dias). Ficou durante dois dias no internamento do HVR para monitorização e teve alta continuando a medicação pós-cirúrgica em casa.

### 2.6.9. Acompanhamento

Após a chegada dos resultados da histopatologia, vários dias após a enucleação, contactou-se a tutora e pediu-se para trazer o animal ao HVR para a informar acerca dos resultados histológicos, remover as suturas e realizar-se outros exames complementares.

Na histopatologia do OD do D. Dinis, destacamos algumas alterações observadas na avaliação microscópica, nomeadamente no estroma da íris e no corpo ciliar, com infiltrados de linfócitos, células plasmáticas e muitos macrófagos, estes últimos com agentes protozoários compatíveis com amastigotas de *Leishmania* spp. (Figura 20A). A cápsula do cristalino surgia amplamente ondulante e desaparecia multifocalmente na sua face anterior, apresentando um infiltrado inflamatório, também presente na úvea, nas membranas fibrovasculares e zonas de rutura da cápsula (Figura 21). Também no estroma da coróide observou-se inflamação granulomatosa idêntica à da úvea anterior com presença de amastigotas de *Leishmania* (Figura 20B) no citoplasma dos macrófagos. Não se observaram restos facilmente identificáveis de retina, embora se observe uma banda de tecido fibrovascular desde a papila do nervo ótico à zona posterior do cristalino, com inflamação e inúmeras amastigotas (Figura 20C).

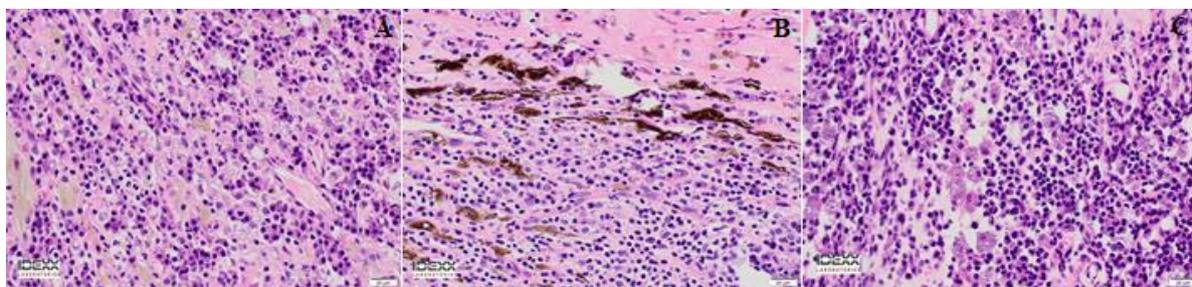


Figura 20 - Amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos em corte histológico do OD do D. Dinis, nas regiões do corpo ciliar (A), coróide (B) e retina (C) (fotografias gentilmente cedidas por Laboratórios Idexx, Madrid).

Perante o diagnóstico da histopatologia (Tabela 19), suspeitámos estar perante um caso de LFel.

Tabela 19 - Resultado da avaliação histológica do OD do D. Dinis.

#### Descrição

- Endoftalmite granulomatosa crónica, marcada, difusa, com formas amastigotas de *Leishmania* spp. intra-histiocíticas, com sinequias posteriores e membranas ciclíticas extensas.;
- Endotelite granulomatosa, crónica, moderada, focalmente extensa, com amastigotas de *Leishmania* spp. intra-histiocíticas;
- Fibrose epicoroideia, difusa, crónica e marcada;
- Catarata hipermetura com rutura da cápsula anterior do cristalino (Figura 21) e macrófagos intralenticulares com *Leishmania* spp. intracitoplasmática;
- Desprendimento completo da retina com atrofia panretiniana e do nervo óptico;
- Queratite neutrofílica, leve, multifocal, crónica, com erosão e ligeira neovascularização periférica estromal.

Aquando da enucleação, apesar da rotura do cristalino não se observaram áreas atípicas sugestivas de neoplasia e para descartar a possibilidade, realizou-se uma coloração PAS para realçar os fragmentos, sem qualquer indício de malignidade, nomeadamente sarcoma pós-traumático.

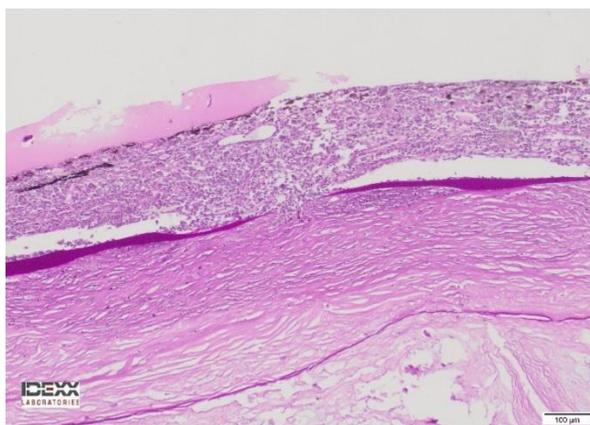


Figura 21 - Imagem histológica que evidencia a rutura do cristalino no OD do D. Dinis (fotografia gentilmente cedida por Laboratórios Idexx, Madrid).

Nas várias alterações observadas, a presença de formas amastigotas de *Leishmania*, levou à realização de ELISA para LFel com resultado positivo (Tabela 20).

Tabela 20 - Resultados do ELISA para *Leishmania*.

Serologia	Resultado
Ac anti- <i>Leishmania</i>	Positivo

Apesar de a LFel ser menos frequente em gatos do que cães, estão descritos casos de inflamação intraocular associados a este parasita em gatos com processos imunossupressores e endócrinos subjacentes. Deste modo, podemos considerar esta infeção, secundária ao FIV descrito na história clínica.

Estes dados laboratoriais indicam que não se deve descartar a hipótese de a infeção por *Leishmania* estar presente em outros órgãos ou tecidos, uma vez que na maior parte dos casos a imunossupressão é generalizada. Por outro lado, no OD do D. Dinis, observaram-se lesões consistentes com traumatismo contundente, que provocou a rutura da cápsula do cristalino, a fibrose das camadas internas da coróide e a atrofia panretiniana sem glaucoma. Outro cenário possível, é que o OD estivesse invisível há mais tempo favorecendo a ocorrência de um traumatismo e a infeção concomitante de *Leishmania*.

Na mesma consulta, para detetar alterações em outros órgãos, para além da pesquisa de LFel, realizaram-se exames complementares, tais como: ecografia abdominal, análise de urina tipo II, com cultura de anaeróbios, rácio UP/C e proteinograma. A ecografia foi difícil de realizar dado o comportamento do D. Dinis, sendo que não se observaram alterações preocupantes nos órgãos abdominais. Observou-se uma urina ligeiramente turva, com depósito, hiperestenúrica, com proteinúria, hematória e presença de cristais de estruvite (2+). Contudo, o exame bacteriológico para pesquisa de aeróbios deu negativo. O rácio UP/C (Anexo VI – Tabela 49) indicou suspeita de proteinúria enquanto no proteinograma (Anexo VI – Figura 24) se observou uma gamopatia policlonal com rácio A/G diminuído (0,34), sugestivo de infeção.

Estabelecido o diagnóstico definitivo de leishmaniose felina em estágio III, FIV e doença periodontal, o D. Dinis foi tratado com Zyloric® 100 mg (10 mg/kg/PO de 12-12 h, durante 6 meses) e alimentação adequada para a patologia dentária (Hills™ Prescription Diet t/d). O prognóstico em termos visuais é reservado, uma vez que tem infeção por lentivírus (FIV) e a LFel está associada ao envolvimento ocular.

Na última vez que reavaliei o D. Dinis, cerca de 3-4 meses após a enucleação, encontrava-se bastante ativo, alerta e bastante consciente. A tutora referia que a sua urina e fezes eram normais, tinha ganho peso e apresentava-se com apetite. Repetiram-se as análises

hematológicas, bioquímicas e serológicas, com melhorias significativas em todos os parâmetros. O hemograma e as bioquímicas estavam excelentes, sem alterações aos valores de referência, excetuando a hiperproteinemia (9,7 g/dl). Serologicamente, todas as diluições *Leishmania* estavam negativas, enquanto títulos de anticorpos anti-*Coronavirus* se revelaram positivos excepto em diluições de 1/2000 (Tabela 21). Na eletroforese de proteínas a relação entre albumina/globulina estava diminuída. Contudo, este quadro clínico encontrava-se associado a uma hiperproteinemia com gamaglobulinémia monoclonal e diluições positivas contra coronavírus superiores a 1/400, suspeitando-se estar na presença de peritonite infecciosa felina (PIF), apesar do exame de estado geral se mostrar satisfatório.

Tabela 21 - Resultados de IFI.

<b>Serologia</b>	<b>Titulações</b>	<b>Resultado</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>Anticorpos anti-<i>Leishmania infantum</i></b>	1/80	Negativo	Valorização dos títulos > 1/160
	1/160	Negativo	
	1/320	Negativo	
	1/640	Negativo	
<b>Anticorpos anti-<i>Coronavirus</i></b>	1/25	Positivo	Valorização dos títulos > 1/400
	1/40	Positivo	
	1/100	Positivo	
	1/200	Positivo	
	1/400	Positivo	
	1/1000	Positivo	
	1/2000	Negativo	

O D. Dinis não voltou a comparecer no HVR, uma vez que era referenciado de outro CAMV, tendo-se obtido informação em março de 2018 de que estava bem-disposto, a comer bem e monitorizado para a LFel.



### 3. DISCUSSÃO

As doenças cujos agentes são transmitidos por insetos vetores são uma ameaça crescente à saúde pública e animal, constituindo a leishmaniose uma doença endêmica em Portugal (Maia *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2010). Na área metropolitana de Lisboa existem alguns casos declarados de leishmaniose em seres humanos. Em cães, verificam-se mais casos de infecção em áreas urbanas do que nas rurais (Cortes *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2010). Nessa região urbana verificou-se elevada prevalência em cães (19,2%) como em gatos (20,3%) (Campino e Maia, 2010; Maia *et al.*, 2010).

Durante os 4 meses de estágio curricular no HVR, em Lisboa, acompanhei 5 casos de LCan e um caso de LFel, sendo estes últimos mais raros no nosso país. Embora em Portugal seja expectável encontrarmos vários casos de LCan, revela-se o aumento da prevalência de LFel.

Associado ao desenvolvimento de leishmaniose em cães e gatos, existem muitos fatores predisponentes como a raça, a idade adulta, a constituição genética, a sazonalidade, a altitude, o habitat e segundo alguns autores, o género masculino (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2017). Cardoso *et al.* (2004), num estudo epidemiológico de LCan realizado no norte de Portugal, no concelho de Alijó, conclui que o género do cão não era um fator relevante para adquirir a doença. No presente estudo, os animais são quase todos machos e apresentavam vários tipos de pelagem, mas não se pode afirmar se este é um fator predisponente relevante. Segundo Gallego *et al.* (2009), os flebotómios têm preferência por se alimentar de zonas do corpo com menos pelo, como é o caso da cabeça, focinho, pavilhões auriculares, zonas perianais e inguinais. No entanto, não podemos menosprezar essa hipótese. No geral, todas as raças de cães podem contrair LCan, havendo uma maior suscetibilidade descrita nos sem raça definida e podengo de Ibiza (Moreno e Alvar, 2002). Dos casos de LCan do HVR apenas o Gil (caso clínico nº 3) era podengo, embora português, e todos eram de outras raças definidas. Nesta região do Mediterrâneo existe maior atividade de insetos flebotómios nos meses quentes, desde a primavera até ao outono (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Uma vez que o período de incubação da infecção pode ir de 3 meses a 1 ano e o meu estágio foi entre setembro e dezembro (perto do final do verão e outono, respetivamente), não podemos considerar a sazonalidade um fator.

No que diz respeito à idade dos animais presentes nesta dissertação, eram todos adultos, com idades compreendidas entre os 3 e os 10 anos e viviam dentro de casa, com exceção do Gil

e do D. Dinis (caso clínico nº 6). O Gil era um podengo adulto, macho inteiro, que vivia fora de casa em ambiente rural e com elevado contacto com roedores. A infeção por *L. infantum* foi outrora considerada rural, mas tem vindo a ser cada vez mais descrita nas áreas urbanas, pelo aumento de cães errantes que contribuem para a disseminação e surgimento de novas infeções (Cortes *et al.*, 2007). Navea-Pérez *et al.* (2015) demonstraram a importância dos roedores selvagens no ciclo da LCan e não só, uma vez que em áreas sem cães foi detetada a presença *L. infantum* em ratos. Pode-se concluir então que é possível manter o parasita sem a necessidade do hospedeiro primário (cão) (Navea-Pérez *et al.*, 2015). Tanto o Black Jack como o Gil tinham história recente de carraças, discutido por alguns investigadores, embora não provada, como uma possível forma de transmissão de LCan. Nos últimos anos têm especulado sobre o papel que as carraças, *Rhipicephalus sanguineus*, têm como potencial vetor de *L. infantum*, apesar de ainda não ser conhecida a sua participação na epidemiologia de LCan (Dantas-Torres, 2011).

Os gatos possuem uma boa resposta celular contra a LFel e, portanto, têm alguma resistência natural à infeção. Os casos publicados de LFel ativa, são maioritariamente de gatos imunodeprimidos, devido a retrovírus, tratamentos imunossupressores, stresse, e doenças concomitantes (tumores malignos ou diabetes) (Mattos *et al.*, 2008; Spada *et al.*, 2013; Pennisi *et al.*, 2015). O D. Dinis havia sido gato de rua, em área urbana, antes de ser adotado e, assim como grande parte dos gatos erráticos, era FIV-positivo. Suspeita-se que este lentivírus, que causou imunossupressão, tenha sido um fator importante para o desenvolvimento da infeção de LFel.

A LCan é uma doença sistémica que pode envolver qualquer órgão e tecido e revelar-se através de variados sinais clínicos não específicos, tais como: alterações no estado geral (com anorexia e perda de peso), a nível dermatológico, linfático, renal, hemorrágico, locomotor, ocular, neurológico, oral e gastrointestinal (Kaszak *et al.*, 2015; Beugnet *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2018).

O Black Jack (caso clínico nº 1), o Bolacha (caso clínico nº 2), o Gil (caso clínico nº 3) e a Moana (caso clínico nº 5) apresentavam à anamnese perda de apetite com consequente perda de peso corporal. O Gil era o que atrofia muscular significativa, mas todos tinham lesões renais, associado a IR com PU/PD. Todos estes apresentavam alterações gastrointestinais com vómitos e fezes moles, no caso do Bolacha e da Moana. O motivo que levou o Black Jack à consulta foi uma epistaxe unilateral intermitente, compatível com as lesões hematológicas descritas por Baneth e Sollano-Gallego (2012) na LCan. No Bolacha, Gil e Moana observaram-se alterações a nível cutâneo, com zonas de lesões não pruríticas e alopecias. As alterações a nível

dermatológico são usualmente as mais visíveis e o que leva os tutores à consulta (Kaszak *et al.*, 2015).

A adenomegalia, local ou generalizada é um dos principais sinais clínicos da doença, embora inespecífico (Pennisi *et al.*, 2015; Kaszak *et al.*, 2015). Esta alteração foi verificada na primeira consulta do Black Jack, do Gil e da Moana, levando-nos a suspeitar de um quadro de infecção.

No que concerne à cavidade oral, as lesões por LCan não são muito frequentes embora estejam descritos nódulos associados por vezes a úlceras (Blavier *et al.*, 2001; Parpaglia *et al.*, 2007). Nenhuma dessas lesões foi observada, estando a halitose, que alguns dos cães apresentaram, muito provavelmente associada a má higiene dentária ou IR.

Os cães afetados exibem usualmente uma prevalência de lesões oculares entre 16-80,5%, frequentemente no segmento ótico anterior (Pugliese *et al.*, 2006; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Também é habitual observar-se granulomas corneais com *Leishmania*, junto às junções muco-cutâneas (Pugliese *et al.*, 2006). O Happy apresentava sinais oculares tais como úlcera de córnea, queratite e distrofia cristalina, suspeitos de processo inflamatório. Contudo, à citologia conjuntival não se observaram leishmânias, o que não significa que as lesões não foram provocadas pela infecção de LCan.

A LFel, quando na forma visceral da doença, envolve órgãos e tecidos como o baço, fígado, linfonodos, medula óssea, rins, cavidade oral e olhos (Pennisi *et al.*, 2015). Os sinais mais frequentes na LFel são cutâneos, presentes em cerca de 50 % dos casos clínicos descritos (Pennisi, 2015). Assim como nos cães, a linfadenomegalia é um sinal clínico frequente na LFel, verificando-se em 50% dos casos descritos na Europa (Pennisi *et al.*, 2015), pois o protozoário apresenta elevado tropismo para os linfonodos (Gramiccia, 2011). No entanto, no presente estudo, não se verificaram quaisquer alterações a nível linfático e cutâneo. As lesões oculares podem ser a única manifestação de LFel, enquanto nos cães, o envolvimento ocular é acompanhado por sinais sistémicos. Dos 46 casos clínicos e 15 descrições histopatológicas relatadas de LFel entre 1989 e 2014 em países Europeus, apenas 20 a 30% apresentavam lesões oculares (Pennisi *et al.*, 2015). Os sinais mais frequentes reportados em gatos são uveíte, blefarite nodular e panoftalmite (Pimenta *et al.*, 2015). O D. Dinis apresentou-se à consulta com a queixa de perda de peso e lesões oculares unilaterais, nomeadamente uveíte e colapso total de cristalino no OD. Na histopatologia realizada ao OD do gato, foi possível observarem-se formas amastigostas de *Leishmania* no interior de macrófagos. Com elevada frequência na leishmaniose felina, são as lesões estomatológicas, como a estomatite associada a gengivite em

25% dos casos descritos (Pennisi *et al.*, 2015). Também o D. Dinis sofria de gengivite crônica associada a doença periodontal e lesões de reabsorção odontoclástica (ou lesões do “colo”), com muita halitose. Segundo Hofmann-Lehmann *et al.* (1998) existe uma correlação entre a infecção por FIV e a ocorrência de lesões de absorção osteoclástica felina.

Para diagnosticar a leishmaniose, e uma vez que os animais apresentavam sinais clínicos diversos, realizou-se a correta anamnese, exame físico, exames laboratoriais e exames complementares necessários de forma a elaborar uma lista de diagnósticos diferenciais precisos (Solano-Gallego *et al.*, 2017). Contudo, o diagnóstico da doença pode não ser sempre fácil uma vez que uma pequena percentagem de animais tem infecção subclínica (Cardoso *et al.*, 2004). Perante as lesões inespecíficas apresentadas pelos cães e gato em consulta no HVR, aprofundou-se o exame físico com uma correta avaliação dermatológica ao Bolacha e oftalmológica ao Happy e D. Dinis. Os exames laboratoriais realizados foram comuns a quase todos os animais envolvidos no estudo, sejam análises ao sangue, urina ou com recurso a imagem diagnóstica. No sangue avaliou-se o hemograma, as bioquímicas no soro e o ionograma, utilizando-se também a eletroforese de proteínas séricas para elaborar o proteinograma. A urina, colhida sempre por técnica de cistocentese, foi útil para uma análise de tipo II com cultura e antibiograma, assim como quantificação de proteínas totais na urina, creatinina e calcular por fim o seu rácio. Sempre que possível colheu-se sangue para detetar *Leishmania* ou outros hemoparasitas através de métodos serológicos, IFI ou ELISA, e método molecular, PCR. No que diz respeito ao exame imagiológico, recorreu-se na maioria dos casos a ecografia abdominal e a radiografia, eletrocardiograma e ecocardiografia, no Bolacha.

No que diz respeito ao perfil hematológico observou-se uma diminuição do hematócrito (Bolacha e Gil), sinal de anemia, associadas tanto a leucopenia (Gil), como leucocitose com neutrofilia e linfopenia (Moana). Está frequentemente associada a LCan a anemia não regenerativa, que pode ser moderada a grave, normocítica e normocrômica (Koutinas *et al.*, 1999; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Embora a linfopenia seja mais observada em cães infetados, a leucocitose moderada e a leucopenia são consideradas inconstantes (Petanides *et al.*, 2008).

No perfil bioquímico do soro foi detetado juntamente com a queixa de PU/PD, o aumento dos valores de creatinina e ureia, sinal de azotemia renal (Solano-Gallego *et al.*, 2011), acompanhados de hipoalbuminemia em três animais (Black Jack, Bolacha e Gil). A Moana apresentava hipoalbuminemia, hipoproteinemia com um aumento do valor sérico de fosfatase alcalina, enquanto outros (Black Jack, Moana e D. Dinis) estavam hiperproteinémicos. A

hiperfosfatase alcalina é frequentemente associada a afeções renais, enquanto a hipoalbuminemia está associada à perda de proteínas por doença hepática, nefropatia, malnutrição ou a combinação de ambos (Koutinas *et al.*, 1999; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Verificou-se também um aumento nos valores de fósforo, relativamente ao intervalo de referência, no Bolacha e no Black Jack, sinal de IR grave. No ionograma realizado ao soro dos animais, foi observada acidose metabólica, no Black Jack, Bolacha e Gil.

Após a realização de eletroforese de proteínas do soro, verificamos que o Black Jack e o Happy tinham aumento das globulinas (as frações  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\gamma$  no primeiro; e  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$  e  $\gamma$  no segundo), policlonal, que se traduz pelo aumento da produção das imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG) e complemento (Nelson e Couto, 2008). Esta hiperproteinemia sérica, anteriormente também descrita, é um sinal frequente de LCan. Contudo, o Black Jack estava com hipoalbuminemia que estava mascarada pela hiperglobulinemia, traduzindo-se num decréscimo do rácio A/G. Na Moana observou-se hipoalbuminemia, hipoproteinemia, com decréscimo de  $\alpha 1$ , aumento de  $\beta 2$  e diminuição do rácio A/G.

Na análise à urina observou-se hiperestenúria em todos os cães com exceção do Happy. O Bolacha apresentava eritrócitos na urina (hematúria) enquanto o Happy estava com lipúria e muitos cristais de estruvite, frequente em urinas alcalinas. O D. Dinis também tinha hiperestenúria, proteinúria, hematúria e cristais estruvite. No exame bacteriológico de aeróbios apenas a cultura da Moana se revelou positiva, por *Klebsiella* spp.

À ecografia observaram-se alterações a nível urinário (Happy), renal (Black Jack, Bolacha, Gil e Happy) e gastrointestinal (Moana). Alguns autores defenderam que 100% dos cães que desenvolvem infeção por LCan apresentam lesões histológicas a nível renal (Martínez-Moreno *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Outras técnicas valiosas de diagnóstico de LCan e LFel na prática clínica são os esfregaços, citologias e culturas de órgãos ou tecidos. Necessitam de equipamento básico e têm elevada especificidade (Noli e Saridomichelakis, 2014). Durante este estágio realizaram-se esfregaços de sangue e conjuntiva para pesquisa de hemoparasitas. No caso do Gil, e dado todo o historial já referido, realizou-se um esfregaço de sangue para pesquisa de *Leptospira*, para além de *Leishmania* através da técnica de microaglutinação (ou teste de aglutinação microscópica) que se revelou negativo.

Na histopatologia utilizam-se cortes de órgãos suspeitos com recurso a colorações específicas, que pode tornar-se num procedimento moroso. Para o correto diagnóstico é necessária a visualização de formas amastigotas, que comparativamente à citologia podem não

ser facilmente encontradas. Quando o parasita não é visualizado não é possível emitir-se o diagnóstico definitivo e temos de recorrer a outra coloração ou técnica imuno-histoquímica (Maia e Campino, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2010; Noli e Saridomichelakis, 2014). É frequente em histopatologias de tecido ocular observar-se alterações no trato uveal (íris, corpo ciliar e coróide), córnea, esclerótica e retina (Leiva *et al.*, 2005). Isto, vai de encontro com o observado na análise histopatológica do OD do D. Dinis, onde foram observadas amastigotas de *Leishmania* intrahistiocíticas na coróide, no corpo ciliar, na retina e no interior da lente, totalmente colapsada. Como já referido, estão descritos casos de lesões intraoculares associadas a este protozoário em gatos com processos imunossupressores e endócrinos subjacentes, pelo que poderíamos considerar esta situação secundária à infeção por FIV descrita. Apesar desta abordagem de diagnóstico ser indicada para a LC (Paltrinieri *et al.*, 2010), os achados oculares no D. Dinis não devem descartar a presença de LV, com alterações em outros órgãos e tecidos. Contudo, não foram registadas alterações sistémicas relevantes no animal.

Para detetar a infeção pela presença de hemoparasitas recorreremos, nos vários casos clínicos, a técnicas serológicas (IFI e ELISA) e moleculares (PCR). A IFI é considerada por alguns, o teste de eleição e utilizado com maior frequência para diagnóstico de leishmaniose (Proverbio *et al.*, 2014). A prova de ELISA tem grande utilidade em laboratório para detetar infeções de LCan, com sensibilidade e especificidade perto dos 100% (Noli e Saridomichelakis, 2014), porém, pode ser insuficiente em gatos pela menor produção de anticorpos comparativamente com os cães (Figueiredo *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2011). Um dos testes mais comercializados é o Leiscan® (ELISA) utilizado, por exemplo, no diagnóstico do Bolacha e do Happy. No caso do gato, D. Dinis, havia sido aplicado o Uranotest® (ELISA) para detetar FIV e FelV, revelando-se seropositividade a FIV. A PCR permite-nos amplificar determinadas sequências do genoma de *Leishmania* e deteta pequenas quantidades do parasita em amostras biológicas (Paltrinieri *et al.*, 2010). Como o Happy apresentou-se à consulta com alterações oculares e havia sido anteriormente diagnosticado com LCan, realizamos um esfregaço conjuntival seguido de PCR, que deu negativa. Dado que a *Leishmania* tem tropismo para diferentes órgãos, o resultado positivo da amostra utilizada (Maia e Campino, 2008), portanto, apesar de não ter sido observada neste caso concreto, não podemos descartar a sua presença no organismo.

O tratamento de leishmaniose é prolongado, dispendioso e implica ao tutor um empenho total. Para iniciar qualquer tratamento é necessário que o animal esteja clinicamente estável, e para isso, alguns investigadores criarem em conjunto um sistema de estadiamento da doença

para cães (Solano-Gallego *et al.*, 2009, 2011; Beugnet *et al.*, 2018). Os animais que se encontravam no estágio mais avançado da doença eram o Black Jack, o Bolacha e o Gil com elevados títulos de anticorpos e IRC grave, embora com poucos sinais clínicos. No estágio III estava a Moana, com titulações igualmente elevadas, proteinúria e valores de creatinina inferiores a 2 mg/dl. O Happy estava provavelmente no estágio II (com suspeita de proteinúria UP/C<0,5 e creat<1,4), mas, caso se verificasse que as lesões oculares observadas fossem causadas por LCan, enquadrar-se-ia no estágio III. O D. Dinis, embora gato, pelas regras de estadiamento elaboradas pelo LeishVet, encontrava-se no estágio III pela presença de lesões oculares com *Leishmania*, embora não se tenham verificado alterações sistémicas significativas.

Após o estadiamento em cada caso específico, adaptaram-se as terapêuticas conforme necessário, tendo em conta os sinais clínicos, a avaliação laboratorial do animal e o parecer do tutor. Embora seja aconselhada a administração isolada de alopurinol em cães no estágio IV de LCan, apenas se sucedeu no Bolacha. O Black Jack, perante as alterações clinicopatológicas, achou-se oportuno submetê-lo a um tratamento combinado com alopurinol e antimonio de meglumida, suplementado ainda com doxiciclina (para a suspeita de rickettsiose) e domperidona. Neste caso, o objetivo era a combinação com miltefosina, que não foi realizada pelo seu risco nefrotóxico. No Gil, achou-se indicado o tratamento combinado com alopurinol e miltefosina, como indicado para o estágio III, embora não seja esse o seu caso. O Happy, apesar da sua serologia e proteinúria, foi tratado com alopurinol isolado, enquanto à Moana foi instituída a terapêutica combinada de alopurinol com antimonio de meglumida. Ao D. Dinis foi feito apenas tratamento com alopurinol durante 6 meses, mostrando-se este eficaz com melhoria do estado geral e resultados serológicos negativos poucos meses após o início da terapêutica.

Grande parte dos animais envolvidos neste estudo teve melhorias dos sinais clínicos após a implementação da terapêutica. Embora em estágio muito grave, o Black Jack e o Gil apresentaram descompensação em algumas situações, por alterações no tratamento, que mais tarde foram corrigidas tendo estes obtido melhorias a nível clínico. No entanto, dada a severidade da doença no Bolacha, com agravamento de sinais clínicos e fraca resposta à hemodiálise peritoneal, foi eutanasiado. Segundo Blavier *et al.* (2001) a presença de lesões cardíacas associadas a LCan é rara. No entanto, ao longo da monitorização do Bolacha observaram-se complexos ventriculares prematuros com taquicardia ventricular que se suspeita serem provocados pela hipertensão sistémica. Estes sinais, podem favorecer a miocardite

visualizada na avaliação ecocardiográfica, e perante todo o cenário do animal, sem qualidade de vida, os tutores tomaram uma decisão para findar o seu sofrimento. Beugnet *et al.* (2018) defendem que a eutanásia poderá ser aceitável perante um mau estado geral e um prognóstico desfavorável. O Happy e a Moana encontram-se estáveis, com qualidade de vida, após tratamento e continuam a realizar as reavaliações necessárias para monitorização da infeção. O D. Dinis, embora sem o globo ocular direito, seropositivo para FIV, melhorou com a terapêutica e encontra-se hoje estável, com muita energia e sem outras manifestações clínicas.

No que diz respeito ao prognóstico de um animal com leishmaniose este é quase sempre mau e devemos ter em atenção o seu estado clínico, gravidade das lesões, progressão da doença e resposta imunitária individual (Solano-Gallego *et al.*, 2011, 2012). O prognóstico em cães e gatos pode ir de bom a mau (Pennisi, 2015). Os animais classificados no estágio III de LCan têm um prognóstico reservado a mau, enquanto no estágio IV o prognóstico é mau (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Gatos adultos, sujeitos a terapêutica médica ou não, podem viver uma vida normal sem que ocorra comprometimento renal (Pennisi, 2015), como poderá ser o caso do D. Dinis. Apesar disto, 5 dos 6 (83,3%) animais estudados encontram-se atualmente clinicamente estáveis e sem agravamento dos sinais clínicos.

A epidemiologia e aspetos clínicos da doença podem ser variados, tornando difícil aos médicos veterinários realizar o diagnóstico seguido de tratamento e controlo seguro da doença. Assim, é de grande importância a consciencialização e implementação de práticas profiláticas para impedir a transmissão da infeção. (Ribeiro *et al.*, 2018)

#### 4. CONCLUSÃO

A leishmaniose é uma zoonose que tem cada vez mais importância entre a comunidade veterinária pela sua diversidade de sinais clínicos e evolução da doença. Como não existe cura clínica é importante ter consciência do ciclo de vida da *Leishmania* e adotar medidas de prevenção e profilaxia para a infeção. Nas últimas décadas verificou-se aumento da sua incidência em humanos e animais de companhia, nomeadamente gatos, que outrora eram considerados hospedeiros acidentais com pouca importância epidemiológica.

Geralmente, quando a infeção é diagnosticada e surgem os sinais clínicos a doença já evoluiu para estádios moderados a graves, associados na maioria dos casos a maus prognósticos.

O tratamento, embora alguns autores já tenham elaborado diretrizes consoante cada estádio, nem sempre é eficaz. A terapêutica deve ser adequada não só consoante os parâmetros já protocolados, mas consoante o animal como indivíduo. É necessária a colaboração total por parte do tutor, uma vez que para além de uma doença de tratamento obrigatório, este é demorado e muito dispendioso. Quando esta não resulta, deve ponderar-se o prognóstico e a qualidade de vida do animal, recorrendo por vezes à eutanásia.

O estágio curricular permitiu-me adquirir conhecimentos nas diversas áreas que me fizeram ganhar confiança acrescida à vontade de continuar a assimilar conhecimentos e desenvolver-me profissionalmente. A partir de sinais clínicos, mesmo que inespecíficos, senti-me capaz de elaborar diagnósticos e protocolos terapêuticos recorrendo a literatura científica. Tive a oportunidade de contactar com vários casos de LCan, mas mais importante, pela primeira vez com um caso de LFel com alterações a nível ocular que me despertou uma enorme curiosidade, com um diagnóstico bastante desafiante que me levou a procurar conhecer mais sobre a doença em gatos e a sua prevalência em Portugal.

A elaboração desta dissertação permitiu-me para além da aprendizagem acerca da doença, desenvolver as minhas capacidades de pesquisa bibliográfica, cruzar referências, organização de ideias e a adequação dos vários termos técnicos.

A leishmaniose nos animais de companhia constitui um risco para a saúde pública devido ao crescente convívio em ambiente familiar e tem vindo a adquirir uma maior importância na prática clínica.



## 5. REFERÊNCIAS

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

Albuquerque A, Campino L, Cardoso L, Cortes S. Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. *Parasites & Vectors* 2017. 10:57-61.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology* 2004; 57(4):1–88.

Amela C, Mendez I, Medina JM. *et al.* Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *European Journal of Epidemiology* 1995; 11:157–161

Athanasίου LV, Saridomichelakis MN, Kontos VI, Spanakos G, Rallis TS. Veterinary Parasitology Treatment of canine leishmaniosis with aminosidine at an optimized dosage regimen : A pilot open clinical trial. *Veterinary Parasitology* 2013; 192(1–3):91–97.

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

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

Baneth G, Solano-Gallego L. Infectious diseases of the dog and cat. 4<sup>a</sup> ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2012.

Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology* 2006; 28:329–337.

Beugnet F, Halos L, Guillot J. Textbook of Clinical Parasitology in dogs and cats. 1<sup>a</sup> edição. 2018; 166-174.

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

Bottero E, Poggi M, Viglione M. Lesioni papulari indotte da *Leishmania* spp. in 8 cani giovani. *Veterinaria*. 2006; 20:33–36.

Bresciani KDS, Serrano ACM, Matos LVS, Mouriz ESM, D’Auria SRN, Perri SHV *et al.* Ocorrência de *Leishmania* spp. em felinos do município de Araçatuba, SP. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010; 19:127–129.

Campino L, Maia C. Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Med Port.* 2010; 23:859-864.

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: 37-42.

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

Cardoso L, Rodrigues M, Santos H, Schoone GJ, Carreta P, Varejão E, Benthem BV, Afonso MO, Alves-Pires C, Semião-Santos SJ, Rodrigues J, Schallig HDFH. Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp . infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology* 2004; 121:21–32.

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

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

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

Coelho WMD, Do Amarante AFT, De Carvalho Apolinário J, Coelho NMD, De Lima VMF, Perri SHV, *et al.* Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. *Parasitol Res.* 2011; 109:1009–13.

Companion Vector-Borne Diseases (CVBD). Canine Leishmaniosis. Bayer Global; 2018 (accedido em janeiro de 2017). Disponível em: <http://www.cvbd.org/en/sand-fly-borne-diseases/leishmaniosis/>.

Cortese L, Pelagalli A, Piantedosi D, Cestaro A, Loria AD, Lombardi P, Avallone L, Ciaramella P. Effects of therapy on haemostasis in dogs infected with *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, or both combined. *Vet Rec* 2009; 164:433-434. a

Cortese L, Sica M, Piantedosi D, Ruggiero G, Pero ME, Terrazano G, Mastellone V, Ciaramella P. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.* 2009; 164:778-782. b

Cortes S, Afonso MO, Alves-Pires C, Campino L. Stray Dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(9):1431-1432.

Costa F, Goto H, Saldanha L, Silva S, Senhorini I, Silva T, Senhorini IL, Silva TC, Guerra JL. Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral Leishmaniasis. *Vet Pathol.* 2003; 40:677–684.

Cotrina JF, Iniesta V, Monroy I, Baz V, Hugnet C, Marañón F, Fabra M, Gómez-Nieto LC, Alonso C. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend against canine leishmaniosis. *Vaccine* 2018; 1-11.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, Maria M, Genaro O, Linardi PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine

visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2005; 128:149–155.

Coutinho MTZ, Linardi MP. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol.* 2007; 147:320–325.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* 2007; 149:139–146.

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

Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.*; 2012; 28:531–538.

Dedola C, Zobba R, Varcasia A, Visco S, Alberti A, Pipia AP, Scala A, Parpaglia MLP. Serological and molecular detection of *Leishmania infantum* in cats of Northern Sardinia, Italy. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 2018; 13:120–123.

Denerolle, P. Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* 1996; 31:137-145.

Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF, Santos RL. Genital Lesions Associated with Visceral Leishmaniasis and Shedding of *Leishmania* sp. in the Semen of Naturally Infected Dogs. *Vet Pathol.* 2005; 43:650-658.

Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). Anexo I Resumo das características do medicamento. 2015 (citado em julho de 2018). Disponível em: <http://medvet.dgav.pt/RCM/Index/2566>.

Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). Anexo I Resumo das características do medicamento. 2017 (citado em maio de 2018). Disponível em: <http://www.medvet.simpodium.pt/RCM/Index/4437>.

Duque GA, Fukuda M, Salvatore JT, Stäger S, Descoteaux A. Leishmania Promastigotes Induce Cytokine Secretion in Macrophages through the Degradation of Synaptotagmin XI. *J Immunol.* 2014; 193:2363-2372.

Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol.* 2007; 144:162-166.

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

Figueiredo FB, Bonna ICF, Nascimento LD, Da Costa T, Baptista C, Pacheco TMV, *et al.* Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-Leishmania em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42:141–145.

Figueiró-Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, Quintana SM, Maia TL. Visceral leishmaniasis (Kala-azar) and pregnancy. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2004; 12:31-40.

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

Freitas E, Melo MN, Costa-Val AP, Michalick MSM. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol.* 2006; 137:159–67.

Geisweid K., Mueller R., Sauter-Louis C, Hartmann K. Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area. *Veterinary Record* 2012; 171:399.

Gimbo A, Scirpo A, Niutta PP, Cristarella S, Caramazza CD. Prime osservazioni sulla presenza di *Leishmania* spp. in utero post-abortivo di cagna. *Atti Societ`a Italiana Scienze Veterinarie* 1994; 48:473–477

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

Gradoni L, Baneth G, Alvar J, Sacks D, Pennisi MG, Desjeux P *et al.* Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. *Intervet Int* 2002; 2:39–48, 57–68.

Gradoni, L., Gramiccia, M. Leishmaniosis. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Volume 1. 6<sup>a</sup> ed. Paris: Office International des Epizooties; 2008; 240–250.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 2005; 35.

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

Grevot A, Hugues PJ, Marty P, Pratlong F, Ozon C, Haas P, *et al.* Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeIV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite* 2005; 12:271–275.

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

Hervás J, Lara FC, Sánchez-Isarria MA, Pellicer S, Carrasco L, Castillo JA, *et al.* Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *J Feline Med Surg.* 1999; 1:101–105.

Hofmann-lehmann R, Berger M, Sigrist B, Schawalder P, Lutz H. Feline immunodeficiency virus (FIV) infection leads to increased incidence of feline odontoclastic resorptive lesions (FORL). *Vet Immunol Immunopathol.* 1998; 65:299-308.

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

Islam A, Rahman L, Islam S, Debnath P, Alam M, Hassan MM. Sero-prevalence of visceral leishmaniasis (VL) among dogs in VL endemic areas of Mymensingh district, Bangladesh. *J Advneced Vet Anim Res.* 2017; 7710:241-248.

Juttner C, Sánchez MR, Landeras ER, Slappendel RJ, Arnold CF. Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Vet Rec.* 2001; 149:176-179.

Kaszak I, Planellas M, Dworecka-Kaszak B. Canine Leishmaniosis - an Emerging Disease. *Ann Parasitol* 2015; 61(2):69-76.

Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol.* 2014; 51:527–538.

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

Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N, Papadopoulos O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2001; 98:247–261.

Lamothe J, Poujade A. Ulcerative glossitis in a dog with leishmaniasis. *Vet Rec.* 2002; 151:182-183.

Leiva M, Lloret A, Peña T, Roura X. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Vet Ophthalmol.* 2005; 8:71–75.

Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop* 2004;9 2:43-53.

Longoni SS, López-Cespedes A, Sánchez-Moreno M, Bolio-Gonzalez ME, Sauri-Arceo CH, Rodríguez-Vivas RI, Marín C. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2012; 35:469-476.

Lopez R, Lucena R, Novales M, Ginel PJ, Martin E, Molleda JM. Circulating Immune Complexes and Renal Function in Canine Leishmaniasis. *J. Vet. Med. B* 1996; 43:469-474.

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

Lunedo SN, Thomaz-Soccol V, Castro EA., Telles JEQ. Immunocytochemical and immunohistochemical methods as auxiliary techniques for histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta Histochemica* 2012; 114. 252-258.

Maia C, Alwassouf S, Cristóvão JM, Ayhan N, Pereira A, Charrel RN. Serological association between *Leishmania infantum* and sand fly fever Sicilian (but not Toscana) virus in sheltered dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors* 2017; 10:92-98.

Maia C, Campino L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol.* 2011; 27(8):341-344.

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

Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebêlo E, Campino L. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol.* 2010; 174:336-340.

Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet Journal* 2009; 179:142-144.

Marcos R, Santos M, Malhão F, Pereira R, Fernandes AC, Montenegro L, Roccabianca P. Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. *Vet Clin Pathology* 2009; 38:201–205.

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 Parasitology* 2007; 145:357–360.

Martínez-Moreno A, Nieto CG, Rodríguez SH. Leishmaniosis Canina - Parasitología Veterinaria. 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1999.

Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Vet Parasitology* 2007; 145:267–73.

Mattos S, Dalmau A, Ossó M, Oliva A, Anglada L, Vives E, Sarobé X. Leishmaniosis felina a propósito de un caso clínico. ¿Nos olvidamos de que existe? *Clínica Veterinaria Pequeños Animales* 2008; 28:233–237.

Meireles JA. Terapêutica e profilaxia da leishmaniose canina. Leishmaniose Canina. Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações; 2008. 93–9.

Mencke N. Future challenges for parasitology: Vector control and “One health” in Europe: The veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis, rickettsiosis and canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 2013; 195: 256-271.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43:5515-5519.

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

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

Montenegro J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. 1926.

Morais RCS, Gonçalves SDC, Costa PL, Silva KG, Silva FJ, Silva RP, Brito MEF, Brandão-Filho SP, Dantas-Torres F, Paiva-Cavalcanti M. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. *Exp Appl Acarol.* 2013; 59:473-481.

Moreira MA., Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. 2007; 145:245-252.

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

Moreno AM, Nieto CG, Rodríguez SH. Parasitologia Veterinaria. 1ª edição. Madrid: McGraw-Hill; 1999; 652-665.

Navarro JA, Sánchez J, Peñafiel-Verdú C, Buendía AJ, Altimira J, Vilafranca M. Histopathological Lesions in 15 Cats with Leishmaniosis. *J Comp Pathol.* 2010; 143:297-302.

Navea-Pérez HM, Díaz-Sáez V, Corpas-López V, Merino-Espinosa G, Morillas-Márquez F, Martín-Sánchez J. *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts? *Parasitol Res.* 2015; 1-8.

Nelson RW, Couto CG. Small Animal Internal Medicine. 5ªed. St. Louis: Elsevier Health Sciences; 2008.

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

Noli C, Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Veterinary Journal* 2014; 202: 2-46.

Norsworthy GD, Grace SF, Crystal MA, Tilley LP. *The Feline Patient*. 4ª edição. Ames: Wiley-Blackwell; 2011; 1052.

Oliva G, Roura X, Crotti A, Maroli M, Castagno M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2010; 236:1192-1198.

Oliva G, Scalone A, Manzillo VF, Gramiccia M, Pagano A, Muccio TD, Gradoni L. Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological, Serologic, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naïve Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:1318-1322.

Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Veterinary Dermatology* 2005; 16:187-191.

Owens SD, Oakley DA, Marrayott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs. *JAVMA*. 2001; 219(8):1076-1083.

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

Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagno M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2010; 236:1184-1191.

Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixão TA, Costa LF, Dengues EG, Diaz AAR, Santos RL. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet Parasitol* 2009; 165:327-331.

Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Vlemmas J, Lekkas S, Karameris A, Frytianos A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 104:227-237.

Parpaglia MLP, Vercelli A, Cocco R, Zobba R, Manunta ML. Nodular Lesions of the Tongue in Canine Leishmaniasis. *J. Vet. Med.* 2007; 54:414-417.

Pennisi MG. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. *Canine Leishmaniasis Mov Towar a Solut.* Sevilha: 2002; 78:39-48.

Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, Oliva G, Solano-Gallego L. Leishvet update and recommendations on feline leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2015; 8:302-319.

Pennisi MG, Hartmann K, Lloret A, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hosie MJ, Lutz H, Marsilio F, Möstl K, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Hozinec MC. Leishmaniasis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2013; 15:638-642.

Pennisi MG. Leishmaniasis of companion animals in Europe: An update. *Veterinary Parasitology* 2015; 208:34-47.

Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, Mischke R, Diniz P, Breitschwerdt EB, Kritseoi M, Garipidou VA, Koutinas CK, Lekkas S. Factors Associated with the Occurrence of Epistaxis in Natural Canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 2008; 22:866-872.

Petersen CA. Leishmaniasis, an Emerging Disease Found in Companion Animals in the United

States. *Top Companion Anim Med.* 2009; 24(4):182-188.

Peters N, Sacks D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006; 213:159-179.

Pimenta P, Alves-Pimenta S, Barros J, Barbosa P, Rodrigues A, Pereira MJ, Maltez L, Gama A, Cristovão JM, Campino L, Maia C, Cardoso L. Feline leishmaniosis in Portugal: 3 cases (year 2014). *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 2015; 1–2:65-69.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, Real G, Ruitenbergh J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infect and Immun* 1994; 62:229-235.

Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, Roumpies N, Papazoglou LG, Saridomichelakis MN, Savvas I, Leondides L. Effects of Allopurinol Treatment on the Progression of Chronic Nephritis in Canine Leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 2006; 20:228-233.

Pocholle E, Giacomo A, Delaunay P, Hasseine L, Marty P. Un cas de leishmaniose féline disséminée dans le sud de la France. *Parasite* 2012; 19:77-80.

Proverbio D, Spada E, Giorgi GB De, Perego R, Valena E. Relationship between *Leishmania* IFAT Titer and Clinicopathological Manifestations (Clinical Score) in Dogs. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:1–5.

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

Pugliese A, Garofano V, Pantano V, Niutta PP. Granuloma corneale da *Leishmania* nel cane. *Atti Societ`a Italiana delle Scienze Veterinarie* 1990; 54:1391-1394.

Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L. Canine Leishmaniasis Associated with Systemic Vasculitis in Two Dogs. *J Comp Pathol* 1991; 105:279-286.

Rakich PM, Latimer KS. Duncan & Prasses Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology. 5<sup>a</sup>ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2011.

Ramsey I. BSAVA Small Animal Formulary. 7<sup>a</sup> ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2011.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009; 128:87-95.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, Genaro O, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clinical and Experimental Immunology* 2006; 146:303-311.

Ribeiro RR, Michalick MSM, Silva ME, Santos CCP, Frézard FJG, Silva SM. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed Res Int*. 2018; 2018:1–12.

Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Frézard F, Michalick MSM. Reduced Tissue Parasitic Load and Infectivity to Sand Flies in Dogs Naturally Infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following Treatment with a Liposome Formulation of Meglumine Antimoniate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2008; 52:2564-2572.

Romero MB, Crespo AE, Llinares MG. Leishmaniose Felina. *Argos VBD Enfermedades Transm por vectores* 2012; 137:46–7.

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

Rougier S, Vouldoukis I, Fournel S, Pérès S, Woehrlé F. Efficacy of different treatment

regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: A pilot study. *Vet Parasitol.* 2008; 153:244-254.

Roura X, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Maroli M, Oliva G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *Vet Journal* 2013; 1–5.

Rüfenacht S, Sager H, Müller N, Schaerer V, Heier A, Welle MM, Roosje PJ. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *Vet Rec.* 2005; 156:542-545.

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

Saz-Villanueva S, Cardoso L, Esteve L, Corrales G, Fondati A, Giménez M, et al. Leishmaniosis - Una revisión actualizada. 2013.

Silva AVM, Cândido CDS, Pereira DP, Brazil RP, Carreira JCA. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Tropica* 2008; 105:92–94.

Shaw SE, Langton DA, Hillman TJ. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: A zoonotic disease waiting for a vector? *Vet Parasitol.* 2009; 163:281-285.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TM a, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009; 160:55-9.

Simões-Mattos L, Mattos MRF, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilaqua CML, Prata-Júnior RC, Holanda CM, Rondon FCM, Bastos KMS, Coêlho ZCB. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Vet Parasitol.* 2005; 127:199-208.

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. *Vet Q.* 1988; 10:1-16.

Smith BE, Tompkins MB, Breitschwerdt EB. Antinuclear Antibodies Can Be Detected in Dog Sera Reactive to *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *Ehrlichia canis*, or *Leishmania infantum* Antigens. *J Vet Intern Med.* 2004; 18:47-51.

Solano-Gallego L, Cardoso L, Pennisi MG, Petersen C, Bourdeau P, Oliva G, Miró G, Ferrer L, Baneth G. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. *Trends Parasitol* 2017; 1-12.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 2000; 90:37-45.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2011; 4:86.

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

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2009; 165:1-18.

Solano-Gallego L, Rodríguez A, Iniesta L, Arboix M, Portùs M, Alberola J. Detection of Anti-*Leishmania* Immunoglobulin G Antibodies in Urine Specimens of Dogs with Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10(5):849-855.

Solano-Gallego L, Villanueva-saz S, Carbonell M, Trotta M, Furlanello T, Natale A. Serological diagnosis of canine leishmaniasis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and *Leishmania* 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. *Parasites & Vectors* 2014; 7:111-121.

Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. *J Infect Dis.* 2004; 189:1729-1733.

Spada E, Proverbio D, Migliazzo A. Serological and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* Infection in Stray Cats in a Nonendemic Area in Northern Italy. *ISRN Parasitol.* 2013. 2013:1–6.

Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res.* 2012; 110:1065–1078.

Tassi P, Ormas P, Madonna M, Carli S, Belloli C, Natale G, Ceci L, Marcotrigiano GO. Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res Vet Sci* 1994; 56:144-150.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. *Veterinary Parasitology*. 4<sup>ed</sup>. Nova Jersey: Wiley Blackwell; 2016; 112.

Terrazzano G, Cortese L, Piantedosi D, Zappacosta S, Loria AD, Santoro D, Ruggiero G, Ciaramella P. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 110:331-337.

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 Journal* 2011; 188(3):346-351.

Torrent E, Leiva M, Segalés J, Franch J, Peña T, Cabrera B, Pastor J. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *J Small Anim Pract* 2005; 46:549-552.

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

Valladares JE, Gopegui RR, Riera C, Alberola J, Gallego M, Espada Y, Portus M, Arbois M. Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Research in Veterinary Science* 1998; 64: 195–198.

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

Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LSV, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, Leutenegger C, Marcondes M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. *Vet Parasitol.* 2011; 178:22-28.

Viegas C, Requicha J, Albuquerque C, Sargo T, Machado J, Dias I, Pires MA, Campino L, Cardoso L. Tongue nodules in canine leishmaniosis - a case report. *Parasites & Vectors* 2012; 5:120-124.

Weese JS, Peregrine A, Fulford M. Companion Animal Zoonoses. 1ª edição. Ames: Wiley-Blackwell; 2011; 40-46.

Whyte AS, Whyte J, Martinez MJ. Atlas de Odontología en Pequeños Animales. 1ª edição. Madrid: Grass Edicions; 1998; 17-38.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis – vector control. WHO; 2018 (acedido em janeiro de 2017). Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/vector-control/en/>.

World Organization for Animal Health (OIE). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2018. OIE; 2018 (acedido em janeiro de 2017). Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2018/>.

## 6. ANEXOS

### 6.1. Anexo I: Caso clínico nº 1

Tabela 22 - Variações de peso do Black Jack durante os 2 meses referentes ao diagnóstico e instauração de plano terapêutico.

Data	06-09-2017	21-09-2017	29-09-2017	10-10-2017	17-10-2017	03-11-2017
Peso (Kg)	41,7	40,85	41,50	39,25	40,40	43,00

Tabela 23 - Apresentação dos resultados obtidos em alguns hemogramas realizados entre o mês de setembro e outubro no HVR.

Descrição	06-09-2017	10-10-2017	17-10-2017	Valores de Referência
WBC (10 <sup>3</sup> /uL)	6,75	7,50	6,84	6,0 – 17,0
NEU (10 <sup>3</sup> /uL)	3,75	4,95	4,55	3,62 – 12,3
LYM (10 <sup>3</sup> /uL)	1,38	0,98	1,01	0,83 – 4,91
MON (10 <sup>3</sup> /uL)	0,84	0,66	0,59	0,14 – 1,97
EOS (10 <sup>3</sup> /uL)	0,78	0,91	0,69	0,04 – 1,62
BAS (10 <sup>3</sup> /uL)	0,00	0	0	0,00 – 0,12
NEU (%)	55,6	66	66,5	52,0 – 81,0
LYM (%)	20,5	13,1	14,8	12,0 – 33,0
MON (%)	12,3	8,8	8,7	2,0 – 13,0
EOS (%)	11,6	12,1	10	0,5 – 10,0
BAS (%)	0,0	0,0	0,0	0,0 – 1,3
RBC (10 <sup>6</sup> /uL)	6,80	6,51	4,57	5,10 – 8,50
HGB (g/dL)	13,7	13,3	8,9	11,0 – 19,0
HCT (%)	45,0	42,1	30	33,0 – 56,0
MCV (fL)	66,2	64,7	65,7	60,0 – 76,0
MCH (pg)	20,2	20,4	19,5	20,0 – 27,0
MCHC (g/dL)	30,5	31,6	29,7	30,0 – 38,0
RDW-CV (%)	14,8	14,9	14,7	12,5 – 17,2
RDW-SD (fL)	41,2	40,9	40	33,2 – 46,3
PLT (10 <sup>3</sup> /uL)	211	283	110	117 – 490
MPV (fL)	9,1	83,4	8,2	8,0 – 14,1
PDW (10GSD)	15,6	15,8	16	12,0 – 17,5
PCT (%)	0,193	0,236	0,090	0,090 – 0,580

Tabela 24 - Resultados das análises bioquímicas séricas do Black Jack, realizadas no HVR, no ano de 2017.

Descrição	13-09	20-09	22-09	24-09	26-09	27-09	29-09	04-10	10-10	17-10	03-11	Valores de Referência
ALP (UI/L)	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<130
GPT/ALT (UI/L)	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<113
Glucose (mg/dL)	84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72-122
Albumina (g/dL)	-	-	2	-	-	-	-	-	2,1	1,5	-	2,2-3,5
Ureia (mg/dL)	114	265	-	112	105	94	143	125	144	130	134	6-25
Creatinina (mg/dL)	3,2	4,34	4,9	4,5	4,7	4,8	4,4	3,7	4,2	3,1	3,4	<2
Proteínas Totais (g/dL)	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,7-6,9
Fósforo (mg/dL)	-	-	10,7	-	-	-	16,9	-	-	-	8,9	2,5-5,6

Tabela 25 - Análises de urina com UP/C realizadas no HVR.

Bioquímica de urina	30-09-2017	11-10-2017	Estadiamento IRIS para DRC (modificado em 2015)
Proteínas Totais (mg/dL)	113,9	97,6	
Creatinina (mg/dL)	104,20	78,08	
Rácio (P.totais/Creatinina) Urina	1,1	1,3	< 0.2 - Não proteinúrico 0.2-0.5 – Suspeito de proteinúria > 0.5 – Proteinúrico

Tabela 26 - Resultados dos ionogramas obtidos por análise laboratorial no HVR.

Descrição	22-09-2017	03-11-2017	Valores de referência
pH	7,3	7,34	7,35-7,45
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	28,5	32,4	35-45
pO <sub>2</sub> (mmHg)	43	31	85-100
BE <sub>ecf</sub> (mmol/L)	-11	-8	0 – (+6)
HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	14,6	17,6	15-23
TCO <sub>2</sub> (mmol/L)	15	19	23-27
SO <sub>2</sub> (%)	76	57	>90
Na (mmol/L)	142	138	135-145
K (mmol/L)	4,6	4,4	3,4-4,9
iCa (mmol/L)	1,33	1,35	1,2-1,40
Glu (mg/dL)	83	-	70-105
Hct (%)	41	31	35-49
Hb (via Hct) (g/dL)	13,9	10,5	12-17

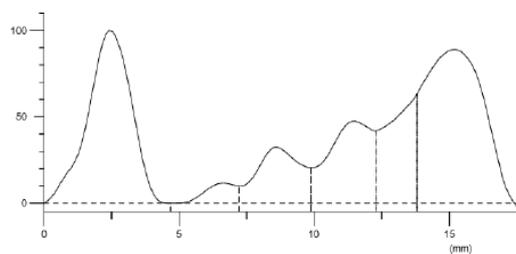
Tabela 27 - Resultados de ecografia abdominal.

<b>Descrição</b>	<b>22-09-2017</b>	<b>02-10-2017</b>
<b>Fígado</b>	Hepatomegália moderada, padrão ecográfico regular e sem lesões focais.	-
<b>Vesícula Biliar</b>	Vesícula biliar moderadamente distendida por conteúdo líquido hipoecogénico, com sedimento moderado e sem sombreamento acústico. Parede ligeiramente polipóide.	-
<b>Baço</b>	Normodimensionado, parênquima homogéneo com uma ecoestrutura conservada. Vasculatura esplénica normal.	-
<b>Rins</b>	Rim esquerdo com 7,7 cm e rim direito com 9,3 cm. Ambos com aumento da ecogenicidade medular e estriação cortical com hiperecogenicidade piélica. Sem dilatação piélica e com perda ligeira de transição corticomedular.	Com as alterações descritas a 22-09-2017.
<b>Bexiga</b>	Distensão moderada, de parede fina, lisa e conteúdo anecoico.	Distensão moderada, sem sedimento no interior. Parede fina e lisa sem alterações evidentes.
<b>Trato Gastrointestinal</b>	As porções observadas apresentam-se sem alterações significativas. Peristaltismo normal	-
<b>Pâncreas</b>	Sem alterações de parênquima e ecoestrutura. Observa-se gordura peripancreática sem alterações	-
<b>Glândulas Adrenais</b>	Normodimensionadas, sem alterações de parênquima e ecoestrutura normal	-
<b>Próstata</b>	Tamanho aumentado, simétrica, de contorno regular, com lobo prostático esquerdo com quisto hipoecogénico de 1 cm diâmetro.	Aumentada com pelo menos 7 cm em corte longitudinal. Ecogenicidade aumentada e presença de líquido livre anecogénico a rodeá-la.
<b>Testículos</b>	Normodimensionados, contornos regulares e ecoestrutura conservada	-
<b>Peritoneu Linfonodos</b>	Sem alterações	-

Tabela 28 - Resultado de rácio UP/C.

<b>Análise</b>	<b>Resultado</b>
<b>Proteínas totais na urina (mg/dl)</b>	113,9
<b>Creatinina na urina (mg/dl)</b>	104,2
<b>Rácio (proteínas totais/creatinina) na urina</b>	1,1

Index	Band	Rel.Area	Conc. (g/dl)	Range (g/dl)
1	Albumina	28.59%	2.57 L	2.70 ... 4.49
2	Alpha 1	2.32%	0.21 L	0.34 ... 0.91
3	Alpha 2	9.31%	0.84	0.24 ... 0.96
4	Beta 1	13.58%	1.22 H	0.29 ... 1.07
5	Beta 2	11.66%	1.05 H	0.22 ... 0.58
6	Gama	34.54%	3.11 H	0.23 ... 1.07
Total			9.00	
Ratio A/G		0.40		



Comentários  
PT: 5,0 - 7,50  
A/G: 0,50 - 1,20

Figura 22 - Resultado de eletroforese de proteínas séricas com proteinograma.

## 6.2. Anexo II: Caso Clínico nº 2

Tabela 29 - Resultados da análise bioquímica.

Descrição	18-11-2017 (manhã)	18-11-2017 (tarde)	Valores de Referência
Ureia (mg/dL)	>200	148	6-25
Creatinina (mg/dL)	8,6	7,1	<2

Tabela 30 - Hemograma, sem alterações relevantes.

Descrição	16-11-2017	Valores de Referência
WBC ( $10^3/uL$ )	10,01	6,0 – 17,0
NEU ( $10^3/uL$ )	8,05	3,62 – 12,3
LYM ( $10^3/uL$ )	1,15	0,83 – 4,91
MON ( $10^3/uL$ )	0,70	0,14 – 1,97
EOS ( $10^3/uL$ )	0,11	0,04 – 1,62
BAS ( $10^3/uL$ )	0,00	0,00 – 0,12
NEU (%)	80,4	52,0 – 81,0
LYM (%)	11,5	12,0 – 33,0
MON (%)	7,0	2,0 – 13,0
EOS (%)	1,1	0,5 – 10,0
BAS (%)	0,0	0,0 – 1,3
RBC ( $10^6/uL$ )	8,61	5,10 – 8,50
HGB (g/dL)	18,4	11,0 – 19,0
HCT (%)	54,4	33,0 – 56,0
MCV (fL)	63,2	60,0 – 76,0
MCH (pg)	21,4	20,0 – 27,0
MCHC (g/dL)	33,8	30,0 – 38,0
RDW-CV (%)	14,9	12,5 – 17,2
RDW-SD (fL)	37,8	33,2 – 46,3
PLT ( $10^3/uL$ )	150	117 – 490
MPV (fL)	8,9	8,0 – 14,1
PDW (10GSD)	16,0	12,0 – 17,5
PCT (%)	0,133	0,090 – 0,580

Tabela 31 - Resultados do ionograma.

Descrição	16-11-2017	18-11-2017	Valores de referência
pH	7,284	7,341	7,35-7,45
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	35,8	27,2	35-45
pO <sub>2</sub> (mmHg)	177	69	85-100
BE <sub>ecf</sub> (mmol/L)	-10	-11	0 – (+6)
HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	17,0	14,7	15-23
TCO <sub>2</sub> (mmol/L)	18	16	23-27
SO <sub>2</sub> (%)	99	93	>90
Na (mmol/L)	138	141	135-145
K (mmol/L)	43	3,7	3,4-4,9
iCa (mmol/L)	1,18	1,08	1,2-1,40
Glu (mg/dL)	91	91	70-105
Hct (%)	4,9	47	35-49
Hb (via Hct) (g/dL)	16,7	16,0	12-17

Tabela 32 - Resultado do tempo de ativação parcial de tromboplastina.

Descrição	18-11-2017 (tarde)	Valores de referência
APTT (s)	116	72-102

Tabela 33 – Resultados do exame de urina tipo II.

Descrição	17-11-2017	Valores de Referência
<b>Exame Físico</b>		
Cor	Amarelo	Amarelo ou âmbar
Aspetto	Límpido	Límpido
Depósito	Ausente	Ausente
Ph	6,5	5,5 – 7
Densidade	1,020	> 1,030
<b>Exame Químico</b>		
Proteínas (g/L)	3+	-
Glucose (mmol/L)	-	-
Corpos cetônicos (mmol/L)	-	-
Urobilinogénio (umol/L)	-	-
Bilirrubina	-	-
Sangue (eritrócitos/uL)	2+	-
<b>Exame microscópico do sedimento</b>		
Cristais	Ausentes	-
Cilindros	Ausentes	-
Eritrócitos (/campo 400)	2-3	<5
Leucócitos (/campo 400)	Raros	<5
Células epiteliais (/campo 400)	Descamação 1-2	-

### 6.3. Anexo III: Caso clínico nº 3

Tabela 34 - Resultados do hemograma.

<b>Descrição</b>	<b>13-10-2017</b>	<b>16-10-2017</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>WBC (10<sup>3</sup>/uL)</b>	5,71	5,26	6,0 – 17,0
<b>NEU (10<sup>3</sup>/uL)</b>	3,64	2,63	3,62 – 12,3
<b>LYM (10<sup>3</sup>/uL)</b>	1,49	2,01	0,83 – 4,91
<b>MON (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0,41	0,36	0,14 – 1,97
<b>EOS (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0,17	0,25	0,04 – 1,62
<b>BAS (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0,00	0,01	0,00 – 0,12
<b>NEU (%)</b>	63,6	49,9	52,0 – 81,0
<b>LYM (%)</b>	26,1	38,2	12,0 – 33,0
<b>MON (%)</b>	7,2	6,9	2,0 – 13,0
<b>EOS (%)</b>	3,1	4,7	0,5 – 10,0
<b>BAS (%)</b>	0,0	0,3	0,0 – 1,3
<b>RBC (10<sup>6</sup>/uL)</b>	4,60	3,67	5,10 – 8,50
<b>HGB (g/dL)</b>	9,6	8,2	11,0 – 19,0
<b>HCT (%)</b>	32,8	26,4	33,0 – 56,0
<b>MCV (fL)</b>	71,3	72,1	60,0 – 76,0
<b>MCH (pg)</b>	20,9	22,5	20,0 – 27,0
<b>MCHC (g/dL)</b>	30,0	31,2	30,0 – 38,0
<b>RDW-CV (%)</b>	14,4	14,3	12,5 – 17,2
<b>RDW-SD (fL)</b>	42,9	42,5	33,2 – 46,3
<b>PLT (10<sup>3</sup>/uL)</b>	218	75	117 – 490
<b>MPV (fL)</b>	9,2	7,4	8,0 – 14,1
<b>PDW (10GSD)</b>	16,0	17,2	12,0 – 17,5
<b>PCT (%)</b>	0,201	0,055	0,090 – 0,580

Tabela 35 - Resultados de análises realizadas anteriormente em outro CAMV.

<b>Descrição</b>	<b>Resultados</b>
<b>Creatinina</b>	4,4
<b>Potássio</b>	5
<b>Ureia</b>	358,4
<b>Proteinúria</b>	14,9
<b>Hematócrito</b>	27,0%

Tabela 36 - Resultados das análises bioquímicas registradas em 2017.

Descrição	13-10	14-10	16-10	18-10	19-10	20-10	22-10	24-10	26-10	31-10	04-11	Valores de Referência
Albumina (g/dL)	1,4	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	2,2-3,5
Ureia (mg/dL)	119	107	78	68	-	55	67	95	74	94	160	6-25
Creatinina (mg/dL)	3,7	3,1	2,7	3,7	-	3,6	4,8	3,6	3,4	3,5	5,6	<2
Fósforo (mg/dL)	-	-	-	18,1	-	-	-	-	-	-	17,4	2,5-5,6

Tabela 37 - Resultados do ionograma sérico.

Descrição	13-10-2017	18-10-2017	20-10-2017	22-10-2017	27-10-2017	Valores de referência
pH	7,390	7,677	7,548	7,495	7,523	7,35-7,45
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	29,5	22,5	32,0	31,6	29,1	35-45
pO <sub>2</sub> (mmHg)	35	118	36	41	47	85-100
BE <sub>ecf</sub> (mmol/L)	7	6	5	1	1	0 – (+6)
HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	17,9	26,4	27,8	24,4	23,9	15-23
TCO <sub>2</sub> (mmol/L)	19	27	29	25	25	23-27
SO <sub>2</sub> (%)	69	99	78	81	87	>90
Na (mmol/L)	138	141	142	142	141	135-145
K (mmol/L)	4,3	5,9	4,2	3,7	3,7	3,4-4,9
iCa (mmol/L)	0,95	0,93	1,03	1,02	1,07	1,2-1,40
Glu (mg/dL)	76	58	85	118	78	70-105
Hct (%)	26	23	29	34	28	35-49
Hb (via Hct) (g/dL)	8,8	7,8	9,9	11,8	9,5	12-17

Tabela 38 - Resultados de ecografias abdominais ao longo do processo terapêutico.

<b>Descrição</b>	<b>13-10-2017</b>	<b>18-10-2017</b>	<b>23-10-2017</b>	<b>27-10-2017</b>
<b>Fígado</b>	Hepatomegalia marcada com parênquima ecogénico	Com parênquima mais hiperecogénico que o habitual e ligeiramente aumentado.	Hepatomegalia marcada com parênquima ecogénico.	Mantém alterações registadas anteriormente.
<b>Vesícula Biliar</b>	Sem alterações dignas de registo.	Com parede mais hiperecogénica e espessa que o habitual com 0,35 cm de espessura e presença de sedimento livre (formando sombra muito ligeira) e presença de estrutura regular (quística) associada a parede com 0,37 cm.	Sem alterações dignas de registo.	Sem alterações dignas de registo.
<b>Baço</b>	Esplenomegalia marcada	Com aumento ligeiro do seu tamanho e ecogenicidade e presença de uma lesão com 0,23 cm ecogénica intraparenquimatosa formando sombra acústica.	Esplenomegalia marcada.	Foco de calcificação/trombo do corpo – estrutura ecogénica e sombra acústica.
<b>Rins</b>	Rins com 7cm, cortical marcadamente ecogénica, pielectasia de 0,3 cm, pequenos focos de calcificação	Rim esquerdo com 7,9 cm (aumentado de tamanho), com cortical ecogénica (mais heterogénea) e boa diferenciação corticomedular com presença de discreto medullary rim sign. Rim direito com 7,5 cm, com as mesmas alterações que o rim contralateral.	Mantém cortical marcadamente ecogénica, pielectasia ligeira e pequenos focos de calcificação	Mantém alterações registadas anteriormente.
<b>Bexiga</b>	Bexiga distendida com sedimento ligeiro	Muito distendida, com sedimento muito ligeiro, sem formação de sombra acústica, parede fina e lisa -0,13 cm.	Bexiga distendida com sedimento ligeiro. Parede ligeiramente irregular na região caudal – vigir.	Estrutura poliploide na região caudal da bexiga – sem significado clínico
<b>Trato Gastrointestinal</b>	Estômago marcadamente distendido com líquido, parede	Estômago com pouco conteúdo mucoso com parede de submucosa muito ecogénica, pregueada com espessamento de 0,7 cm, observe	Estômago vazio, parede espessada e pregueada. Jejuno espessado.	Mantém alterações registadas anteriormente.

	espessada e pregueada. Jejunó espessado.	presença de estrutura com 2 cm hipoecogénica (sem sombra) junto à parede (que pode apenas ser parede – dado o estômago estar mais vazio ou alimento húmido ou massa – vigiar por favor com outro grau de repleção). Duodeno com 0,42 cm, sem outras alterações óbvias.		
<b>Pâncreas</b>	Sem alterações dignas de registo.	Sem alterações dignas de registo.	Sem alterações dignas de registo.	Sem alterações dignas de registo.
<b>Glândulas Adrenais</b>	Sem alterações dignas de registo.	Adrenal esquerda com 0,59 cm de tamanho, sem alterações óbvias da sua ecogenicidade, textura e limites.	Sem alterações dignas de registo.	Sem alterações dignas de registo.
<b>Próstata</b>	Ligeiramente aumentada, homogénea.	Com 2,2x2,6 cm de tamanho, mais ecogénica que o habitual	Ligeiramente aumentada, homogénea, e uretra espessada.	Mantém alterações registadas anteriormente.
<b>Testículos</b>	Sem alterações dignas de registo	Simétricos e mais ecogénicos que o habitual, sendo que o mediastino testis forma sombra	Sem alterações dignas de registo.	Sem alterações dignas de registo.
<b>Peritoneu</b>	Sem alterações dignas de registo	Líquido livre anecogénico generalizado em quantidade moderada por toda a cavidade abdominal. Generalizado.		Sem líquido livre.
<b>Linfonodos</b>	Adenomegalia moderada dos mesentéricos e ilíacos	Linfonodos ilíacos mediais com 1 cm de tamanho, ecogénicos, homogéneos	Adenomegalia moderada dos mesentéricos e ilíacos.	Mantém alterações registadas anteriormente.
<b>Comentários</b>	Quadro muito sugestivo de nefrite/glomerulonefrite marcada com GE urémica associada	A presença de líquido livre anecogénico generalizado em quantidade moderada – hipoalbuminemia – é compatível com transudado. A esplenomegalia e linfadenomegalia – associado a doença infecciosa (linfoma), a estrutura	Mantém quadro de nefrite/glomerulonefrite e gastrite urémica.	Vasos distendidos – hipertensão?

esplénica encontrada é compatível com calcificação do parênquima. Aspeto renal compatível com nefrite/glomerulonefrite associada a doença infecciosa (linfoma). As alterações gástricas encontradas sugerem a presença de gastrite urémica (inflamação/neoplasia da parede), sendo que o achado deve ser vigiado, pois pode ser apenas comida e ser transitório (não apresenta sombra e isso é mais estranho). A vesícula biliar apresenta alterações compatíveis com colecistite, sendo que a estrutura encontrada pode ser compatível com quisto da parede.

Tabela 39 - Resultados da análise de urina tipo II, colhida a 13 de outubro de 2017.

<b>Descrição</b>	<b>18-10-2017</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>Exame Físico</b>		
<b>Cor</b>	Amarelo	
<b>Aspeto</b>	Límpido	
<b>Depósito</b>	Ausente	
<b>pH</b>	6,0	5 - 7,5
<b>Densidade</b>	1,018	1,013-1,029
<b>Exame Químico</b>		
<b>Proteínas (g/L)</b>	3+	
<b>Glucose (mmol/L)</b>	-	
<b>Corpos cetónicos (mmol/L)</b>	-	
<b>Urobilinogénio (umol/L)</b>	-	
<b>Bilirrubina</b>	-	
<b>Sangue (eritrócitos/uL)</b>	+	
<b>Exame microscópico do sedimento</b>	-	
<b>Cristais</b>	Ausentes	
<b>Cilindros</b>	Ausentes	
<b>Eritrócitos (/campo 400)</b>	Raros	<5
<b>Leucócitos (/campo 400)</b>	Raros	<5
<b>Células epiteliais (/campo 400)</b>	Descamação 1-2	

Tabela 40 - Resultados do esfregaço de sangue para pesquisa de hemoparasitas.

**Exame microscópico em 17-10-2017**

- Normocitose e normocromasia eritrocitária;
- Número estimado de leucócitos confirma a ligeira leucopénia obtida por contagem automática;
- Presença de linfócitos reativos (sugerem a estimulação ativa do sistema imunitário – inespecífica);
- Com agregação plaquetária. A contagem de plaquetas feita pelo contador celular não foi confirmada pela observação do esfregaço sanguíneo, onde as plaquetas se encontravam em número considerado adequado. A “pseudo-trombocitopénia” deve-se provavelmente à agregação plaquetária;
- Não se identificaram formas evidentes de hemoparasitas mas este facto não os exclui e em caso de suspeita clínica deve ser confirmado por serologia ou PCR.

#### 6.4. Anexo IV: Caso clínico nº 4

Tabela 41 - Resultados dos hemogramas do Happy.

<b>Descrição</b>	<b>28-09-2017</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>WBC (10<sup>3</sup>/uL)</b>	8,82	6,0 – 17,0
<b>NEU (10<sup>3</sup>/uL)</b>	5,11	3,62 – 12,3
<b>LYM (10<sup>3</sup>/uL)</b>	2,55	0,83 – 4,91
<b>MON (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0,62	0,14 – 1,97
<b>EOS (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0,54	0,04 – 1,62
<b>BAS (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0	0,00 – 0,12
<b>NEU (%)</b>	58	520 – 81,0
<b>LYM (%)</b>	28,9	12,0 – 33,0
<b>MON (%)</b>	7	2,0 – 13,0
<b>EOS (%)</b>	6,1	0,5 – 10,0
<b>BAS (%)</b>	0	0,0 – 1,3
<b>RBC (10<sup>6</sup>/uL)</b>	6,58	5,10 – 8,50
<b>HGB (g/dL)</b>	13,5	11,0 – 19,0
<b>HCT (%)</b>	40,6	33,0 – 56,0
<b>MCV (fL)</b>	61,7	60,0 – 76,0
<b>MCH (pg)</b>	20,5	20,0 – 27,0
<b>MCHC (g/dL)</b>	33,2	30,0 – 38,0
<b>RDW-CV (%)</b>	14	12,5 – 17,2
<b>RDW-SD (fL)</b>	35,6	33,2 – 46,3
<b>PLT (10<sup>3</sup>/uL)</b>	250	117 – 490
<b>MPV (fL)</b>	9,2	8,0 – 14,1
<b>PDW (10GSD)</b>	15,7	12,0 – 17,5
<b>PCT (%)</b>	0,229	0,090 – 0,580

Tabela 42 - Resultados das bioquímicas do Happy.

<b>Descrição</b>	<b>28-09-2017</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>ALP (UI/L)</b>	66	<130
<b>GPT/ALT (UI/L)</b>	32	<113
<b>Glucose (mg/dL)</b>	109	72-122
<b>Albumina (g/dL)</b>	2,2	2,2-3,5
<b>Ureia (mg/dL)</b>	16	6-25
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	1,1	<2
<b>Proteínas Totais (g/dL)</b>	6,7	4,7-6,9

Tabela 43 - Rácio UP/C do Happy.

<b>Análise</b>	<b>Resultado</b>
<b>Proteínas totais na urina (mg/dl)</b>	37,9
<b>Creatinina na urina (mg/dl)</b>	141,07
<b>Rácio (proteínas totais/creatinina) na urina</b>	0,3

Tabela 44 - Resultados da análise de urina tipo II.

<b>Descrição</b>	<b>28-09-2017</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>Exame Físico</b>		
<b>Cor</b>	Amarelo	
<b>Aspeto</b>	Ligeiramente turvo	
<b>Depósito</b>	Presente	
<b>pH</b>	9,0	5 - 7,5
<b>Densidade</b>	1,048	1,013-1,029
<b>Exame Químico</b>		
<b>Proteínas (g/L)</b>	2+	
<b>Glucose (mmol/L)</b>	-	
<b>Corpos cetónicos (mmol/L)</b>	-	
<b>Urobilinogénio (umol/L)</b>	-	
<b>Bilirrubina</b>	-	
<b>Sangue (eritrócitos/uL)</b>	-	
<b>Exame microscópico do sedimento</b>		
<b>Cristais</b>	Estruvite 3+	
<b>Cilindros</b>	Ausentes	
<b>Eritrócitos (/campo 400)</b>	Raros	<5
<b>Leucócitos (/campo 400)</b>	Raros	<5
<b>Células epiteliais (/campo 400)</b>	Descamação 1-2	
<b>Observações</b>	Lipúria 2+	

Tabela 45 - Resultados da ecografia abdominal.

<b>Descrição</b>	<b>24-10-2017</b>
<b>Fígado</b>	Normodimensionado, parênquima homogéneo, contornos regulares e ecoestrutura conservada. Segmentos observados dos grandes vasos, veia porta e veias supra hepáticas normais.
<b>Vesícula Biliar</b>	Parede normal, moderadamente distendida por sedimento abundante sem sombreamento acústico
<b>Baço</b>	Normodimensionado, parênquima homogéneo com uma ecoestrutura conservada. Vasculatura esplénica normal.
<b>Rins</b>	Ambos os rins de tamanho normal e contornos regulares, com aumento da ecogenicidade medular e hiperecogenicidade dos recessos piélicos com sombreamento acústico ligeiro, sem sinais de pielectasia.
<b>Bexiga</b>	Moderadamente distendida por conteúdo líquido anecogénico com sedimento flutuante muito abundante e cristalúria.
<b>Trato Gastrointestinal</b>	As porções observadas apresentam-se sem alterações significativas. Peristaltismo normal.
<b>Pâncreas</b>	Sem alterações de parênquima e ecoestrutura. Gordura perihepática sem alterações.
<b>Glândulas Adrenais</b>	Normodimensionadas, sem alterações de parênquima e ecoestrutura normal.
<b>Próstata</b>	Simétrica, bilobada, com contornos regulares. Parênquima homogéneo. Uretra prostática normal.
<b>Testículos</b>	Normodimensionados, contornos regulares, ecoestrutura conservada.
<b>Peritoneu</b>	Sem alterações ecográficas.
<b>Linfonodos</b>	Sem alterações ecográficas.
<b>Comentários</b>	O exame ecográfico do Happy é consistente com a presença de sedimento e cristalúria vesical abundantes, aparentemente sem presença de urólitos vesicais ou renais. A nível da vesícula biliar identifica-se também sedimento abundante. Ambas as alterações devem ser vigiadas clínica e ecograficamente.

## 6.5. Anexo V: Caso clínico nº 5

Tabela 46 - Resultados do hemograma.

Descrição	26-09-2017	Valores de Referência
<b>WBC (10<sup>3</sup>/uL)</b>	25,80	6,0 – 17,0
<b>NEU (10<sup>3</sup>/uL)</b>	23,81	3,62 – 12,3
<b>LYM (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0,52	0,83 – 4,91
<b>MON (10<sup>3</sup>/uL)</b>	1,14	0,14 – 1,97
<b>EOS (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0,32	0,04 – 1,62
<b>BAS (10<sup>3</sup>/uL)</b>	0,02	0,00 – 0,12
<b>NEU (%)</b>	92,30	52,0 – 81,0
<b>LYM (%)</b>	2,10	12,0 – 33,0
<b>MON (%)</b>	92,30	2,0 – 13,0
<b>EOS (%)</b>	1,20	0,5 – 10,0
<b>BAS (%)</b>	0,00	0,0 – 1,3
<b>RBC (10<sup>6</sup>/uL)</b>	5,43	5,10 – 8,50
<b>HGB (g/dL)</b>	11,10	11,0 – 19,0
<b>HCT (%)</b>	34,70	33,0 – 56,0
<b>MCV (fL)</b>	63,90	60,0 – 76,0
<b>MCH (pg)</b>	19,90	20,0 – 27,0
<b>MCHC (g/dL)</b>	31,20	30,0 – 38,0
<b>RDW-CV (%)</b>	12,90	12,5 – 17,2
<b>RDW-SD (fL)</b>	34,70	33,2 – 46,3
<b>PLT (10<sup>3</sup>/uL)</b>	417,00	117 – 490
<b>MPV (fL)</b>	10,50	8,0 – 14,1
<b>PDW (10GSD)</b>	16,00	12,0 – 17,5
<b>PCT (%)</b>	1,439	0,090 – 0,580

Tabela 47 Resultados das análises bioquímicas do soro.

Descrição	06-09-2017	Valores de Referência
<b>ALP (UI/L)</b>	151	<130
<b>GPT/ALT (UI/L)</b>	28	<113
<b>Glucose (mg/dL)</b>	86	72-122
<b>Albumina (g/dL)</b>	< 1	2,2-3,5
<b>Ureia (mg/dL)</b>	9	6-25
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,8	<2
<b>Proteínas Totais (g/dL)</b>	3,6	4,7-6,9

Tabela 48 - Resultados de microbiologia, urocultura e antibiograma.

<b>Análises</b>	<b>Resultados</b>
Exame bacteriológico cultural	
Microorganismo isolado	Klebsiella spp.
Contagem de colônias	> 10 <sup>5</sup> UFC/ml
<b>Antibiograma</b>	
Ampicilina	Resistente
Amoxicilina/Ácido clavulânico	Sensível
Cefalexina	Sensível
Gentamicina	Sensível
Amicacina	Sensível
Tetraciclina	Sensível
Florfenicol	Sensível
Imipenem	Sensível
Trimetropim-sulfametoxazol	Sensível
Enrofloxacina	Sensível
Ciprofloxacina	Sensível
Marbofloxacina	Sensível
Pradofloxacina	Sensível
Fosfomicina	Sensível
Nitrofurantoína	Resistente

## 6.6. Anexo VI: Caso clínico nº6

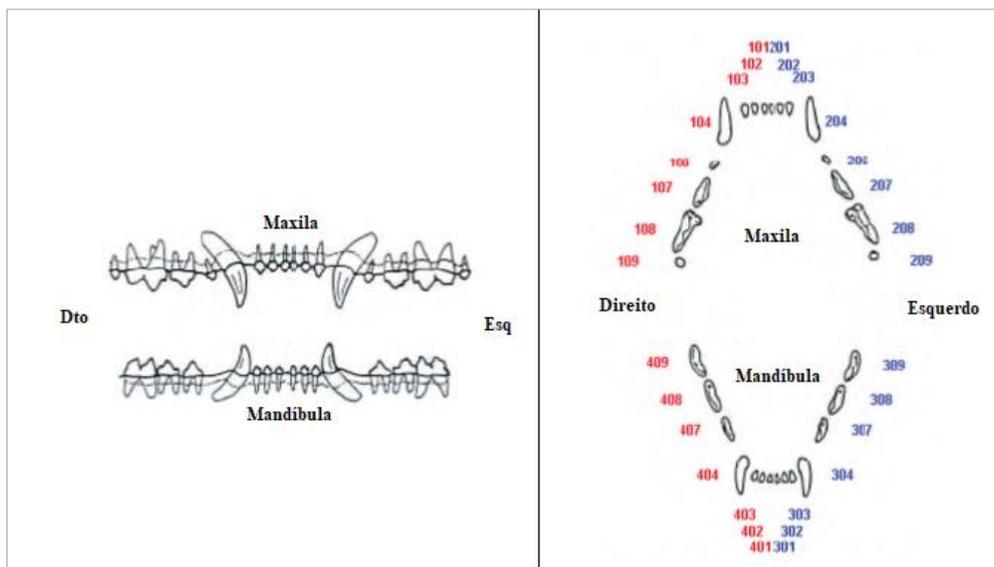
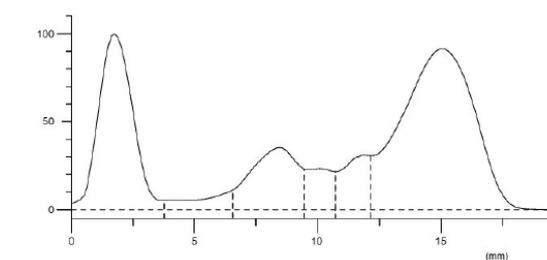


Figura 23 - Sistema de Triadan modificado de gato (adaptado de Norsworthy *et al.*, 2011).

Index	Band	Rel.Area	Conc. (g/dl)	Range (g/dl)
1	Albumina	25.28%	2.60 L	2.90 ... 4.67
2	Alpha 1	2.88%	0.30	0.21 ... 0.50
3	Alpha 2	12.02%	1.24 H	0.29 ... 0.10
4	Beta 1	4.49%	0.46 H	0.15 ... 0.45
5	Beta 2	5.90%	0.61 H	0.15 ... 0.49
6	Gama	49.42%	5.09 H	0.43 ... 2.14
Total			10.30	
Ratio A/G		0.34		



Comentários  
PT: 6.0-8.2  
A/G: 0.53-1.36

Figura 24 - Resultados do proteinograma do D. Dinis realizado a 31 de maio de 2017.

Tabela 49 - Rácio UP/C do D. Dinis a 30 de maio de 2017.

Análise	Resultado
Proteínas totais na urina (mg/dl)	86,7
Creatinina na urina (mg/dl)	295,39
Rácio (proteínas totais/creatinina) na urina	0,3