



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

LEISHMANIOSE CANINA – ESTUDO DE 158 CASOS DA REGIÃO DE LISBOA

CATARINA PINHEIRO ROMBERT PINHÃO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares  
Pereira da Fonseca de Sampaio  
Doutora Maria Manuela Grave  
Rodeia Espada Niza  
Doutor Virgílio da Silva Almeida

ORIENTADORA

Doutora Maria Manuela Grave  
Rodeia Espada Niza

2009  
LISBOA

---

## AGRADECIMENTOS

- À Professora Doutora Maria Manuela Rodeia, por me ter apoiado nesta nova aventura, sem nunca desistir. Sem os seus bons conselhos e boa disposição nunca teria conseguido;
- À Professora Doutora Isabel Neto, por todo o apoio e disponibilidade, por me ter obrigado a pensar e a definir objectivos;
- Ao Professor Doutor António Ferreira, por me ter disponibilizado o acesso às fichas clínicas, sem elas este trabalho não poderia ter sido realizado;
- A todo o pessoal do Laboratório de Análises Clínicas Professor M. Braço Forte da F.M.V.-U.T.L, na pessoa do Professor Doutor José Henrique Duarte Correia, pela disponibilidade e fácil acesso;
- Aos serviços do Laboratório de Parasitologia da F.M.V.-U.T.L, em especial ao Professor Doutor Luís Carvalho e à Lídia, pela prontidão e total disponibilidade demonstradas;
- À Ivana, pela ajuda inestimável;
- Aos meus pais e irmãos, por terem despertado a minha curiosidade e por terem fomentado sempre a minha vontade de aprender;
- Aos meus amigos.

## RESUMO

A leishmaniose canina é uma doença parasitária de grande importância no nosso país e em toda a bacia Mediterrânea.

É uma zoonose, sendo o seu principal reservatório o cão. Nestes animais, o desenrolar da doença clínica está dependente da resposta imunitária desenvolvida, havendo maior prevalência de animais infectados do que de animais doentes.

O objectivo deste estudo foi caracterizar a população no momento do diagnóstico, a nível de sexo, idade, raça, local onde habitam, isto é, interior ou exterior, sintomatologia, análises hematológicas e bioquímicas, meio de diagnóstico e mês de diagnóstico.

A maior parte dos resultados obtidos estão de acordo com o que está descrito na bibliografia. Existe uma maior predominância de animais do sexo masculino (n=105/158; 66,5%) e a maioria dos animais foi diagnosticada entre os 2 e os 8 anos (n=109/158; 74,9%). Os animais mais frequentemente encontrados eram de raça indeterminada (n=41/158; 25,9%). Para além destes, estão presentes animais de 30 raças, sendo os mais frequentes animais de grande porte, como o Boxer (n=17/158; 17%), o Rottweiler (n=14/158; 10,8%), o Labrador Retriever (n=12/158; 7,6%) e o Pastor Alemão (n=11/158; 7%). Em 53 casos (n=53/158; 33,54%) foi possível determinar que os animais passavam grande parte do tempo ao ar livre.

A sintomatologia apresentada era maioritariamente inespecífica, com emagrecimento (n=58/158; 36,7%), linfadenomegália (n=57/158; 36,08%), alopecia (n=43/158; 27,22%) e descamação (n=43/158; 27,22%).

As principais alterações hematológicas foram anemia (n=59/89; 66,3%), trombocitopenia (n=44/72; 61,1%) e leucopenia (n=16/89; 18%). Dentro do leucograma, os animais apresentaram eosinopenia (n=33/84; 39,3%), linfopenia (n=32/85; 37,5%), neutrofilia (n=24/86; 27,9%) e monocitose (n=10/84; 11,9%).

As principais alterações bioquímicas foram aumento dos níveis séricos de ureia (n=35/77; 45,5%) e de creatinina (n=30/80; 37,5%), hiperproteinemia (n=18/48; 37,5%), hipalbuminemia (n=22/45; 48,9%) e hiperglobulinemia (n=23/30; 76,7%).

O diagnóstico foi obtido na maioria das vezes por IFI (n=110/125; 88%), tendo sido efectuado ao longo de todo os meses do ano.

Palavras-chave: cão, Leishmania, apresentação clínica, alterações hematológicas

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic disease of great importance in Portugal and in all of the Mediterranean basin.

It's a zoonosis, the dog being the main reservoir host. In these animals, the development of clinical disease is dependent of the type of immune response, being well known that the prevalence of the infection is superior to the prevalence of the disease.

The objective of this study was to characterize the population in the moment of diagnosis, in terms of sex, age, breed, life style, clinical signs, haematology and biochemistry alterations, diagnostic method and month of diagnostic.

Most of the results obtained in this study are accordingly to the references. Males are over represented (n=105/158; 66,5%) and most of the animals were between 2 and 8 years of age at diagnosis (n=109/158; 74,9%). The most frequently found animals were of undetermined breed (n= 41/158; 25,9%). Besides them, there are animals from 30 breeds, mainly from large ones, like the Boxer (n=17/158; 17%), the Rottweiler (n=14/158; 10,8%), the Labrador Retriever (n=12/158; 7,6%) and the German Sheperd (n=11/158; 7%). In 53 cases (n=53/158; 33,54%) it was possible to determine that the animal had spent much of its time in the outside.

Most of the animals presented unspecific signs, with weight loss (n=58/158; 36,7%) linfadenopathy (n=57/158; 36,08%), alopecia (n=43/158; 27,22%) and scaling (n=43/158; 27,22%).

Main haematological alterations were anaemia (n=59/89; 66,3%), thrombocytopenia (n= 44/72; 61,1%) and leucopenia (n=16/89, 18%). In the leucogram, the animals presented eosinopenia (n=33/84; 39,3%), lymphopenia (n=32/85; 37, 5%), neutrophilia (n=24/86; 27,9%) and monocytosis (n=10/84; 11,9%).

In terms of biochemistry results, the main alterations were the high seric levels of urea (n=35/77; 45,5%), creatinine (n=30/80; 37,5%), total proteins (n=18/48; 37,5%), and globulins (n=23/30; 76,7%). The levels of albumin were low in most of the cases (n=22/45; 48,9%).

The diagnosis was performed mainly with the use of IFAT (n=110/125; 88%), during all months of the year.

Key-words: dog, Leishmania, clinic presentation, haematological alterations

## ÍNDICE

RESUMO.....	II
ABSTRACT .....	III
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS .....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS .....	VII
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Etiologia.....	1
1.2. Patogenia .....	2
1.3. Sintomatologia .....	4
1.4. Meios de diagnóstico .....	8
1.5. Exames complementares.....	11
1.6. Meios de prevenção.....	13
1.7. Terapêutica específica.....	15
1.7.1. Antimoniais pentavalentes .....	16
1.7.2. Alopurinol.....	18
1.7.3. Associação de antimoniato de N-metil-glucomina com alopurinol .....	19
1.7.4. Pentamidina .....	20
1.7.5. Aminosidina .....	20
1.7.6. Anfotericina B.....	21
1.7.7. Anfotericina B lipossomal.....	22
1.7.8. Miltefosina.....	22
1.7.9. Metronidazol e espiramicina.....	23
1.7.10. Imunoterapia .....	24
1.8. Terapêutica de suporte .....	24
2. OBJECTIVOS DO ESTUDO .....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1. Amostra .....	26
3.2. Métodos estatísticos .....	26
4. RESULTADOS .....	26
5. DISCUSSÃO .....	31
6. CONCLUSÃO.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Phlebotomus perniciosus (♂; 40x).....	1
Figura 2 – Amastigotas de Leishmania infantum em esfregaço de MO de cão (1000x).....	2
Figura 3 – Promastigotas de L. infantum (IFI) (400x).....	2
Figura 4 – Eritema e dermatite do plano nasal.....	5
Figura 5 – Magreza extrema e úlceras de decúbito.....	5
Figura 6 – Descamação furfurácea.....	6
Figura 7 – Pododermatite.....	6
Figura 8 – Úlcera de decúbito.....	6
Figura 9 – Lesão nos pontos de apoio.....	6
Figura 10 – Atrofia muscular ("cabeça de velha").....	7
Figura 11 – Blefaro-conjuntivite.....	7
Figura 12 – Hiperqueratose das almofadinhas plantares.....	8
Figura 13 – Aspecto de um teste IFI com resultado positivo (400x).....	9
Figura 14 – a), b) e c) Amastigotas de L. infantum em MO de cão (a) e c) 400x; b) 1000x).	11

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Raças presentes no estudo .....	27
Tabela 2 - Sintomatologia apresentada pelos animais.....	28
Tabela 3 – Valores hematológicos obtidos no dia de apresentação.....	29
Tabela 4 - Valores bioquímicos obtidos no dia de apresentação .....	30
Tabela 5 - Distribuição dos casos por mês de diagnóstico .....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

Alb - albumina

ALT – alanina amino-transferase

AST – aspartato amino-transferase

BUN – “blood urea nitrogen”; ureia

BQ - bioquímica

Crea - creatinina

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

FAS – fosfatase alcalina

DAT – aglutinação directa

dl - decilitro

DNA – ácido desoxirribonucleico

fl - fentolitro

FMV – UTL - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa

g – grama

Glob - globulinas

h – hora

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IFI – imunofluorescência indirecta

IFAT – “immunofluorescent-antibody test”; IFI

IFN-  $\gamma$  – interferão  $\gamma$

IL – interleucina

kg - kilograma

mg – miligrama

MO – medula óssea

nº - número

NNS – neutrófilos não segmentados

PTs – proteínas totais

PCR – polymerase chain reaction

pg - picograma

RNA – ácido ribonucleico

Th – T helper

UI – unidades internacionais

$\mu$ l - microlitro

% - percentagem



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Etiologia

A Leishmaniose canina é uma zoonose provocada por protozoários do género *Leishmania*. Estes são transmitidos através da picada de fêmeas de insectos do género *Phlebotomus* (figura 1) na Europa e *Lutzomyia* na América do Sul. Na Europa, a espécie mais frequente é *Leishmania infantum*, tendo a sua maior expressão na região da bacia mediterrânica. O restante território europeu é considerado livre desta parasitose, embora a doença esteja a alastrar em direcção ao Norte através dos Alpes e Pirinéus (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008). Casos pontuais foram detectados em Inglaterra, associados a deslocações de animais provenientes de países infectados (Kontos & Koutinas, 1993; Trotz-Williams & Gradoni, 2003).



Figura 1 – *Phlebotomus perniciosus* (♂; 40x)

Em Portugal, estão referidos três focos de elevada prevalência de leishmaniose na espécie canina. A região do Alto-Douro é a que apresenta os valores mais elevados, com uma seroprevalência de 18.7%, a região metropolitana de Lisboa, cujos valores variam entre os 3.8 e os 8.8%, dependendo tratar-se de área urbana ou rural, e por último o Algarve, com 7% (João, Pereira, Cortes & Santos-Gomes, 2006).

*Leishmania* necessita de dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida. No caso de *L. infantum*, o hospedeiro invertebrado é um insecto do género *Phlebotomus*, e o vertebrado é usualmente o cão ou o Homem. O insecto, ao alimentar-se num hospedeiro infectado, ingere formas amastigotas (figura 2), isto é, sem flagelo e não móveis, presentes em macrófagos da pele. Ao atingir o intestino do hospedeiro invertebrado, o parasita multiplica-se e transforma-se na forma promastigota, flagelada (figura 3). Depois desta transformação, migra para as glândulas salivares do vector, sendo posteriormente inoculado aquando da próxima refeição.

As leishmanias, uma vez no hospedeiro vertebrado, transformam-se na forma amastigota, penetrando nos macrófagos, sendo assim disseminadas por todo o corpo do animal (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn & Jennings, 1996). Embora possa atingir outros vertebrados, como gatos e roedores, o cão é considerado o principal reservatório deste parasita.

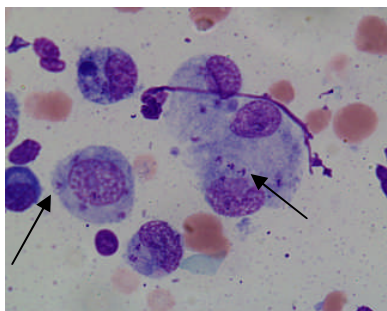


Figura 2 – Amastigotas de *Leishmania infantum* em esfregaço de MO de cão (1000x)

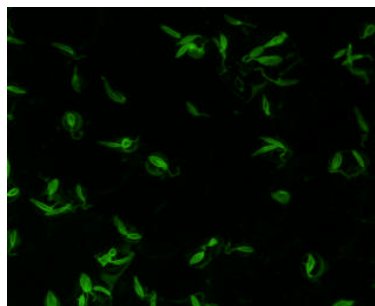


Figura 3 – Promastigotas de *L. infantum* (IFI) (400x)

## 1.2. Patogenia

Estudos recentes apontam para que a patogenia da leishmaniose assente sobretudo numa resposta desadequada por parte do sistema imunitário (Ferrer, 2002; Miranda, Martorell, Costa, Ferrer & Ramis, 2006; Baneth et al., 2008).

O sistema imunitário pode desenvolver dois tipos de respostas: uma humoral, com a produção de anticorpos e envolvimento dos linfócitos B, e outra celular, com o envolvimento de células T.

O tipo de resposta que o animal desenvolve contra o parasita é considerado o factor decisivo na evolução da doença. A leishmaniose, ao ser provocada por um parasita estritamente celular, necessita da participação dos linfócitos Thelper (Th) 1, presentes aquando de uma resposta do tipo celular, para que os macrófagos consigam controlar eficazmente a infecção, permanecendo o hospedeiro assintomático (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Ferrer et al., 1995; Fayet, 1999).

Contrariamente, os animais que desenvolvem uma resposta predominantemente do tipo humoral, com a participação de células Th 2 e uma elevada produção de anticorpos, desenvolvem quadros clínicos severos com prognóstico reservado, devido à deposição de complexos imunes (Ferrer, Aisa, Roura & Portús, 1995; Ferrer, 2002; Ciaramella & Corona, 2003; Miranda et al., 2006).

A activação da resposta celular conduz à produção de interferão- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) pelas células Th 1 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, que activa os macrófagos responsáveis pela eliminação dos parasitas (Ferrer et al., 1995; Ferrer, 2002). Além do interferão- $\gamma$ , as células Th 1 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> levam também à produção de interleucina (IL) 2, factor de necrose tumoral- $\alpha$  e IL-12, todos com características protectoras em relação à doença (Ciaramella & Corona, 2003).

Quando a resposta é humoral, as células Th 2 produzem IL-4, IL-6 e IL-10, associadas à progressão da infecção para doença clínica (Ciaramella & Corona, 2003).

A eficácia da terapêutica específica baseia-se na reversão do tipo de resposta imunitária, tornando-a predominante celular (Miranda et al. 2006). Foi defendido que os cães que desenvolviam doença clínica encontravam-se fortemente imunodeprimidos, com contagens de células CD<sub>4</sub><sup>+</sup> muito baixas, bem como com um rácio CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/ CD<sub>8</sub><sup>+</sup> inferior ao de cães saudáveis (Ferrer, 2002). Porém, outros estudos (Miranda et al., 2006), não conseguiram encontrar variação significativa no rácio CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/ CD<sub>8</sub><sup>+</sup> entre cães afectados clinicamente e animais sãos, nem anteriormente ao tratamento nem 1 ano após este. Aquando do diagnóstico, verificou-se que os cães severamente afectados, com resposta celular inexistente, apresentavam uma contagem de células CD<sub>4</sub><sup>+</sup> inferior àqueles que exibiam uma sintomatologia discreta, com resposta celular activa (Miranda et al., 2006). Contudo, estas alterações não foram estatisticamente significativas em relação ao grupo de controlo, composto por animais saudáveis. Na avaliação um ano depois, foi detectado um aumento na percentagem de células CD<sub>4</sub><sup>+</sup> no grupo de cães severamente afectados em relação ao grupo controlo.

Assim, e contrariando o que tinha sido proposto (Ferrer, 2002), as diferentes subpopulações de linfócitos não parecem poder ser utilizadas como indicador de prognóstico em canídeos com leishmaniose (Miranda et al., 2006). Em alternativa, foi proposto que se utilize o perfil de expressão de citocinas pelas células mononucleares periféricas (PMBC), tendo especial atenção a IL-4, IL-2 e IFN- $\gamma$  (Miranda et al., 2006).

São então os animais que desenvolvem um estado “anérgico”, com depleção das células T e proliferação das células B, com excessiva produção de anticorpos, alguns deles auto-anticorpos, que exprimem clinicamente a doença (Kontos & Koutinas, 1993; Slappendel, 1995; Fayet, 1999; Ciaramella & Corona, 2003). Esta situação permite uma disseminação rápida do parasita por todo o organismo do animal, através da migração dos macrófagos. Os anticorpos, ao opsonizarem as formas amastigotas da leishmania, acabam por favorecer a sua entrada nos macrófagos, essenciais para o desenvolvimento da doença (Slappendel, 1995; Fayet, 1999).

É reconhecido que factores genéticos têm um papel relevante no desenvolvimento da doença e no tipo de resposta imunitária que o animal apresenta. Certas raças oriundas de

zonas onde esta parasitose é endêmica, como acontece com os Podengos de Ibiza, apresentam uma resposta imunitária predominantemente celular, e por isso protectora contra a infecção por este protozoário. Para além disto, foram realizados estudos de sequenciação genética que mostraram que cães com determinadas mutações em genes específicos são mais resistentes à doença do que aqueles que não as têm (Ferrer, 2002). Este tipo de estudos permitiu demonstrar que a prevalência da infecção é muito superior à que era anteriormente reconhecida. Existe uma elevada percentagem de animais que, estando infectados, não o demonstram clinicamente nem serologicamente, pelo que a prevalência da infecção é muito superior à da doença (Ferrer et al., 1995; Fayet, 1999; Ferrer, 2002; Miranda et al., 2006).

Foi demonstrado que em zonas endêmicas, muitos dos casos de leishmaniose surgem secundariamente a factores que provocam imunodepressão, como outras parasitoses, infecções, determinados medicamentos e doenças crónicas. Ao alterarem o tipo de resposta imunitária que o animal desenvolve, levam à ruptura do equilíbrio existente entre hospedeiro e parasita, o que se traduz na expressão clínica da leishmaniose (Ferrer, 2002).

Dependendo da resistência e do tipo de resposta imunitária que o hospedeiro desenvolve, o período de incubação desta parasitose pode variar desde um mês até anos (Kontos & Koutinas, 1993; Trotz-Williams & Gradoni, 2003), ou nunca se revelar a doença (Slappendel, 1988). Devido ao longo período de incubação, é incomum encontrar animais com menos de 1 ano de idade com expressão clínica da doença (Kontos & Koutinas, 1993).

### 1.3. Sintomatologia

Os canídeos com leishmaniose podem apresentar diversos sintomas, reflectindo a deposição de complexos imunes nos diferentes tecidos do organismo. Por ser uma doença de sintomatologia inespecífica, esta torna-se difícil de diagnosticar apenas pela história pregressa e apresentação clínica (Kontos & Koutinas, 1993).

Os anticorpos, em vez de terem uma função protectora, tornam-se fortemente prejudiciais, sendo responsáveis pela maior parte dos sintomas associados a esta doença. É a deposição de complexos imunes no tecido renal que leva ao desenvolvimento de glomerulonefrite. A insuficiência renal decorrente da deposição de anticorpos nos tecidos constitui a principal causa de morte. Pode ainda haver deposição de complexos imunes nos vasos sanguíneos, tecidos oculares, pele e articulações o que conduz ao aparecimento de diversos sintomas, como epistaxis, uveíte, conjuntivite e episclerite imunomediada, úlceras cutâneas e das pontas das orelhas, hiperqueratose, queratite do plano nasal e claudicação por poliartrite (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Fayet, 1999; Ciaramella &

Corona, 2003; Trotz-Williams & Gradoni, 2003). Os animais afectados podem apresentar ainda alterações na coagulação, devido à vasculite e trombocitopénia, bem como disfunção plaquetária decorrente da urémia (Slappendel, 1988; Fayet, 1999).



Figura 4 – Eritema e dermatite do plano nasal

A competição parasitária pelos nutrientes e a anorexia devida a sintomatologia renal conduzem ao emagrecimento (figura 5). A este associa-se a anemia, ficando os animais progressivamente mais fracos e apáticos, podendo mesmo tornar-se letárgicos. Esta letargia é uma das causas que levam os proprietários a procurar o veterinário (Fayet, 1999).

A diminuição da actividade física, principalmente visível em animais de trabalho, traduz-se por episódios de fraqueza. Esta pode dever-se à anemia, atrofia muscular, insuficiência renal ou perturbações no aparelho locomotor, decorrentes da progressão da doença (Kontos & Koutinas, 1993).



Figura 5 – Magreza extrema e úlceras de decúbito

É, na maioria dos casos, uma doença arrastada, subaguda a crónica, com desenvolvimento progressivo da sintomatologia ao longo de meses. Os casos agudos, que se acompanham normalmente com manifestações febris, são muito raros (Ciaramella & Corona, 2003).

Sendo uma doença progressiva, os animais apresentam história de emagrecimento ao longo de vários meses, com perda ou aumento do apetite, consoante os casos, e lesões cutâneas concomitantes (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Denerolle, 1996; Fayet, 1999;

Trotz-Williams & Gradoni, 2003). As principais alterações cutâneas são a má qualidade do pêlo, a descamação furfurácea (figura 6), a presença de úlceras nas zonas de decúbito (figuras 5, 8 e 9) e na ponta das orelhas. Estas lesões são geralmente não pruriginosas. É frequente a ocorrência de hiperqueratose do plano nasal e das almofadinhas plantares, assim como o crescimento exagerado das unhas, onicogribose, e unhas quebradiças. Os animais podem ainda apresentar alopecia, que geralmente tem início na zona da cabeça e orelhas, atingindo depois o tronco e membros. Esta pode também localizar-se em redor dos olhos, dando origem a uma imagem característica de “óculos” (Slappendel, 1988; Trotz-Williams & Gradoni, 2003; Kontos & Koutinas, 1993; Fayet, 1999). As lesões cutâneas, principalmente as úlceras, representam focos de elevado risco de propagação da doença, devido à presença de parasitas. Histologicamente, a pele destes animais revela uma dermatite difusa (figura 7), não supurativa, com presença de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos infectados (Fayet, 1999). Nalguns casos, a dermatite pode tornar-se pustular, surgindo pústulas a nível do tronco, abdómen, axilas e virilhas (Fayet, 1999; Trotz-Williams & Gradoni, 2003; Denerolle, 1996).

Nalgumas raças, como o Boxer e o Bullmastif, são por vezes observados nódulos cutâneos, de dimensões variáveis, que correspondem a uma acumulação de células inflamatórias, principalmente macrófagos, com presença de um elevado número de formas amastigotas do parasita (Fayet, 1999; Ciaramella & Corona, 2003).



Figura 6 – Descamação furfurácea



Figura 7 – Pododermatite



Figura 8 – Úlcera de decúbito



Figura 9 – Lesão nos pontos de apoio

Ocorre atrofia muscular, principalmente a nível dos músculos crotáfitas, o que dá aos animais o aspecto característico denominado de “cabeça de velha” (Fayet, 1999; Kontos & Koutinas, 1993) (figura 10). Esta atrofia, juntamente com a alopecia peri-ocular e a onicogribose, cria um quadro de envelhecimento repentino, sendo um dos principais aspectos apontados pelos proprietários (Ciaramella & Corona, 2003).

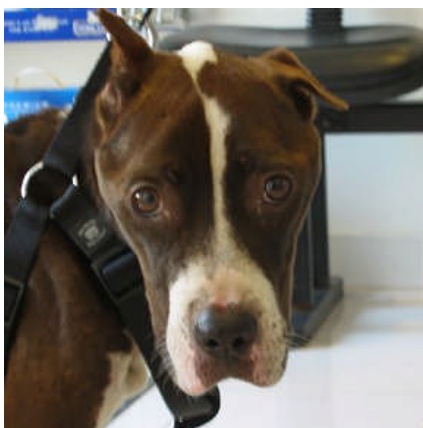


Figura 10 – Atrofia muscular ("cabeça de velha")

Cerca de 89% dos canídeos afectados apresentam linfadenomegália, que se pode restringir apenas a um dos linfonodos ou ser generalizada. A esplenomegália ocorre em cerca de 54% dos casos (Ciaramella & Corona, 2003).

A nível ocular, os canídeos apresentam com muita frequência uveíte, conjuntivite e queratite superficial crónicas (Trotz-Williams & Gradoni, 2003). Associada a estas lesões, pode também estar presente conjuntivite bilateral, com edema da conjuntiva (Fayet, 1999). Cerca de 16% dos animais com leishmaniose apresentam apenas sintomatologia ocular (Ciaramella & Corona, 2003) (figura 11).



Figura 11 – Blefaro-conjuntivite

A epistáxis é geralmente unilateral e intermitente, sendo um sinal clínico comum. Pode ser causada por trombocitopénia, úlceras nasais ou vasculite por deposição de complexos imunes (Kontos & Koutinas, 1993).

A nível do aparelho locomotor, os animais apresentam claudicação, que pode ser devida a polimiosite e atrofia muscular ou a poliartrite por deposição de complexos imunes. Nos casos mais severos, pode haver osteólise (Trotz-Williams & Gradoni, 2003), principalmente nos ossos longos, apresentando os animais dor à palpação e à flexão/extensão dos membros. É possível isolar amastigotas a partir do líquido sinovial e de material de biópsia óssea (Ciaramella & Corona, 2003).

A claudicação também se pode dever a lesões a nível das almofadinhas plantares (figura 12) ou das unhas (Kontos & Koutinas, 1993).



Figura 12 – Hiperqueratose das almofadinhas plantares

Nos animais que desenvolvem insuficiência renal, ocorre polidipsia, poliúria, anorexia e vômito (Ciaramella & Corona, 2003). Os mesmos sintomas podem ser decorrentes de hepatite crónica granulomatosa, embora esta esteja presente em apenas 5% dos casos (Ciaramella & Corona, 2003; Kontos & Koutinas, 1993).

Ocasionalmente pode surgir colite crónica (Trotz-Williams & Gradoni, 2003; Fayet, 1999). Estes quadros clínicos acompanham-se de diarreia aquosa, com laivos de sangue vivo e muco, associada a tenesmo e a frequência de defecação aumentada. A imagem endoscópica revela hiperémia da mucosa do cólon e presença de pequenas úlceras. No exame histológico, observa-se a mucosa infiltrada com linfoplasmócitos, histiócitos e formas amastigotas de *Leishmania* (Ciaramella & Corona, 2003).

#### 1.4. Meios de diagnóstico

O diagnóstico de leishmaniose é efectuado através de serologia, observação directa do parasita ou por métodos moleculares. Contudo, o facto de um animal ser positivo para leishmania por observação directa do parasita em esfregaço de medula não significa que

este esteja doente, apenas que está infectado, sendo portador do parasita. Assim, deve-se ter sempre em conta o exame clínico do animal, de modo a interpretar correctamente os achados laboratoriais (Fayet, 1999; Ciaramella & Corona, 2003).

Os métodos serológicos são normalmente utilizados como primeira abordagem. No entanto, estes métodos apresentam uma sensibilidade de apenas 63%, devido a nem todos os cães desenvolverem uma resposta humoral e a respectiva seroconversão (Fayet, 1999; Trotz-Williams & Gradoni, 2003).

Podem ser usadas diversas técnicas – imunofluorescência indirecta (IFI), aglutinação directa (DAT), ELISA, imunodifusão e imunomigração rápida (Fayet, 1999).

A IFI é a mais utilizada. Detecta a produção de anticorpos anti-leishmania, não o parasita em si, através da utilização de placas com antígeno e de anti-anticorpos marcados com fluoresceína. Quando existem anticorpos anti-leishmania, estes ligam-se ao antígeno, permitindo depois observar fluorescência ao microscópio óptico (Prescott, Harley & Klein, 2002) (figura 13). É um dos testes mais sensíveis, no entanto, um resultado negativo não exclui que o animal esteja afectado, uma vez que há animais que demoram algum tempo a desenvolver a resposta humoral e a atingir títulos de anticorpos considerados positivos. Assim, em animais clinicamente suspeitos ou com resultados duvidosos, isto é, com títulos de 1/80, considerado por muitos laboratórios como o valor a partir do qual o animal é considerado positivo (Ciaramella & Corona, 2003), deve-se repetir o teste passadas 4 a 6 semanas ou recorrer a outro tipo de teste. Embora não haja uma relação directa entre a severidade da doença e o título de anticorpos, este pode revestir-se de alguma importância, uma vez que as variações nos títulos podem dar indicações sobre a eficácia do tratamento ou sobre eventuais recidivas (Fayet, 1999; Ferrer et al., 1995).

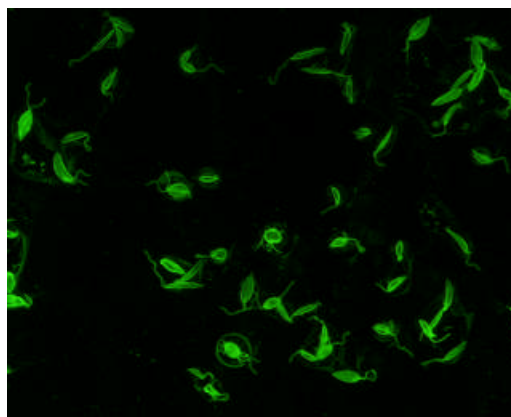


Figura 13 – Aspecto de um teste IFI com resultado positivo (400x)

A imunodifusão é muitas vezes usada em complementaridade com a IFI. Baseia-se na reacção de precipitação entre anticorpos e antígenos, num meio de agar gel (Prescott et al.,

2002). Através da utilização de campos eléctricos, são produzidos diferentes arcos de precipitação, com diferentes significados (Fayet, 1999).

A aglutinação directa apresenta elevada especificidade e sensibilidade, podendo ser realizada a partir de soro, sangue inteiro ou plasma (Fayet, 1999). É uma técnica que permite a leitura dos resultados a olho nu, uma vez que são formados grandes agregados de anticorpos e antigénios. Com esta técnica é avaliada a presença de anticorpos (Prescott et al., 2002).

Actualmente existem testes rápidos, baseados nas técnicas de ELISA e na imunomigração rápida, destinados a serem realizados em clínicas veterinárias. Contudo, estes testes não são muito fiáveis, sendo comuns os falso negativos no caso da ELISA e os falso positivos na imunomigração rápida (Fayet, 1999). A ELISA é uma técnica que permite detectar anticorpos ou antigénios, conforme o que se pretende. Baseia-se na reacção antigénio-anticorpo, havendo uma última reacção com um anticorpo marcado, que provoca uma reacção colorida no caso do resultado ser positivo (Prescott et al., 2002).

A observação directa do parasita é considerado o diagnóstico mais fiável desta doença. Pode ser feita em esfregaços de medula óssea (figuras 14 a), b) e c)), obtidos por punção de costela, da crista ilíaca ou do fémur, esfregaços de linfonodo e, muito raramente, esfregaços de baço ou ainda através de biópsia cutânea (Fayet, 1999; Ferrer et al., 1995; Ciaramella & Corona, 2003).

O número de parasitas obtido é muito variável, não havendo correlação com a gravidade da sintomatologia. Por vezes é muito difícil observá-los, principalmente em animais em fase inicial da doença ou naqueles que já estão em tratamento, não sendo por isso os resultados negativos incomuns. Assim, este meio de diagnóstico apresenta alta especificidade, embora a sua sensibilidade seja baixa, cerca de 50% no caso de esfregaços de medula óssea, valores que decaem para os 30% no caso de esfregaços de linfonodo (Fayet, 1999; López, 2007).

Quando os parasitas não são visíveis, pode fazer-se uma cultura a partir de medula óssea ou de aspirado de linfonodo, utilizando meios específicos, como o Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) ou o RPMI-1640 (Fayet, 1999; Trotz-Williams & Gradoni, 2003).

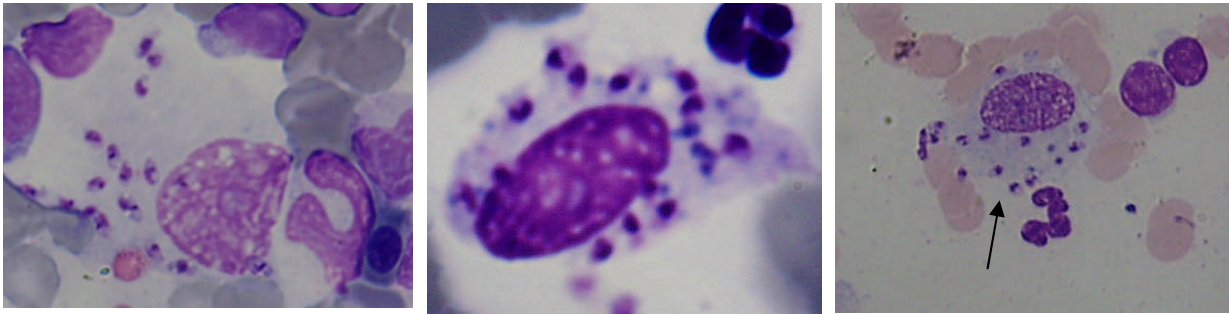


Figura 14 – a), b) e c) Amastigotas de *L. infantum* em MO de cão (a) e c) 400x; b) 1000x)

O PCR é um método com 100% de sensibilidade (Fayet, 1999).

Em casos fortemente suspeitos, mas em que as técnicas serológicas ou a observação directa do parasita são inconclusivas, está indicada a sua realização (Manna et al., 2007).

Esta técnica permite amplificar quantidades muito reduzidas de DNA específico, de modo a posteriormente ser mais facilmente identificado (Prescott, et al., 2002). O material utilizado pode ser o aspirado de medula óssea ou de linfonodo, ou mesmo sangue.

Infelizmente, o seu elevado custo não permite que seja realizado de forma rotineira (Fayet, 1999; Trotz-Williams & Gradoni, 2003). Embora seja muito sensível, este teste não permite uma análise quantitativa da carga parasitária, apenas uma análise qualitativa (Manna et al., 2007).

Existem ainda testes baseados na resposta celular, que são o teste de Montenegro, o teste da blastogénese dos linfócitos e a medição da produção de interferão  $\gamma$  pelas células mononucleares periféricas. Contudo, estes testes exigem procedimentos complexos, pelo que são apenas utilizados em investigação.

### 1.5. Exames complementares

Uma vez realizado o diagnóstico definitivo, e antes de se iniciar o tratamento, deve-se avaliar detalhadamente o animal, de modo a estabelecer as medidas terapêuticas mais adequadas a cada situação. Com esse objectivo, deve proceder-se à realização do hemograma, parâmetros bioquímicos renais e hepáticos, proteinograma e urianálise (Ferrer et al., 1995; Fayet, 1999; Trotz-Williams & Gradoni, 2003).

A maioria dos cães com leishmaniose apresenta anemia (Strauss-Ayali & Baneth, 2000; Amusatogui, Sainz, Rodriguez & Tesouro, 2003; Baneth et al., 2008) normocítica, normocrómica, não regenerativa ou fracamente regenerativa (Fayet, 1999; Trotz-Williams &

Gradoni, 2003; Ciaramella & Corona, 2003). Estas alterações no hemograma devem-se à supressão da medula óssea e ao facto de ser uma doença inflamatória crónica (Kontos & Koutinas, 1993).

Em 25% dos animais com leishmaniose, o hemograma revela também leucopénia, com desvio à esquerda da linha neutrofílica e linfopénia associada (Fayet, 1999; Ferrer, 2002; Trotz-Williams & Gradoni, 2003). Esta parece estar presente apenas nas fases mais avançadas da doença (Amusatogui et al., 2003), referindo alguns autores que na fase inicial existe leucocitose devida a neutrofilia (Amusatogui et al., 2003; Bourdoiseau, 2006). Podem ainda estar presentes monocitose e linfocitose (Gough, 2007).

A urianálise revela proteinúria em cerca de 85% dos animais (Slappendel, 1988; Fayet, 1999). Quando no sedimento urinário se encontram também eritrócitos, leucócitos e células epiteliais renais, é muitas vezes indicativo de uma nefrite aguda ou de um processo de reagudização de uma nefrite pré-existente. Assim, a proteinúria está geralmente associada a valores aumentados de ureia e creatinina no sangue (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Fayet, 1999; Trotz-Williams & Gradoni, 2003).

Tem sido atribuído aos parâmetros renais valor prognóstico. Este é reservado quando os níveis de ureia e creatinina se encontram persistentemente elevados, mesmo após o tratamento (Ciaramella & Corona, 2003).

A nível hepático, os valores da fosfatase alcalina (FAS), da alanina amino-transferase (ALT), e da aspartato amino-transferase (AST) podem encontrar-se aumentados (Fayet, 1999; Trotz-Williams & Gradoni, 2003). Contudo, a lesão hepática não é, normalmente, severa, tendo tendência a normalizar após o tratamento (Ciaramella & Corona, 2003).

O proteinograma revela uma hiperproteinémia marcada em cerca de 80% dos casos, devido ao aumento das globulinas, principalmente das  $\beta$  e  $\gamma$  globulinas, mantendo-se as  $\alpha$ -globulinas dentro de valores normais e ocorrendo frequentemente uma diminuição da albumina sérica (Kontos & Koutinas, 1993; Fayet, 1999; Ciaramella & Corona, 2003; Trotz-Williams & Gradoni, 2003; Amusatogui et al., 2003; López, 2007). A hipoalbuminémia é devida a má nutrição, a doença hepática ou a nefropatia com perda de proteína, que se instalam no decurso da doença (Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella & Corona, 2003). Recentemente, foi descrito a ocorrência de síndrome nefrótico devido a glomerulonefrite associada a leishmaniose (Félix et al., 2008). Em casos em que a perda de proteínas plasmáticas é muito severa, como acontece aquando de hemorragias frequentes ou de diarreia severa, pode observar-se hipoproteinémia, ao contrário do habitual em animais com leishmaniose (Ciaramella & Corona, 2003).

Em relação ao proteinograma, as  $\beta_1$  e  $\beta_2$  globulinas aumentam mais precocemente, seguindo-se as  $\beta_3$  e  $\gamma$  globulinas, o que conduz ao traçado electroforético característico, em que as  $\beta$  e  $\gamma$  globulinas aparecem fundidas num único pico. O proteinograma permite não só orientar o diagnóstico, como também dar indicações sobre a cronicidade da doença. A normalização dos valores do proteinograma traduz geralmente a eficácia do tratamento (Denerolle, 1996; Ciaramella & Corona, 2003).

#### 1.6. Meios de prevenção

Actualmente, a única forma de prevenir a leishmaniose, é evitar a picada do vector infectante.

Embora haja estudos com o objectivo de criar uma vacina eficaz contra este parasita, esta ainda não foi conseguida (López, 2007). Os progressos em relação ao conhecimento da patogenia da doença permitiram compreender que uma vacina eficaz terá de induzir uma forte resposta das células Th1, protectoras contra a infecção pela leishmania (López, 2007). Têm sido desenvolvidas vacinas com antigénios específicos e DNA, mas é necessário o seu aperfeiçoamento, uma vez que ainda persistem algumas questões, tanto a nível de tolerância e segurança para os cães vacinados, como a nível da distinção entre animais naturalmente infectados e vacinados. Outra preocupação da comunidade científica é determinar qual a percentagem de cães não infectados que deverá ser vacinada, de modo a que esta acção tenha impacto na saúde pública (Bourdoiseau, 2006; Miró, Cardoso, Pennisi, Oliva & Baneth, 2008).

A prevenção da leishmaniose, tanto em cães saudáveis como nos já infectados, deve ser realizada através da conjugação de métodos químicos e de manejo.

Os insectos do género *Phlebotomus* são mais activos ao amanhecer e entardecer, sendo desaconselhada a permanência de cães no exterior nesses períodos do dia, de modo a diminuir a probabilidade de serem picados. Assim, deve aconselhar-se os proprietários que evitem passear os seus animais nesses períodos ou, no caso de animais que vivam no exterior, os resguardem (Ciaramella & Corona, 2003).

Devem também usar-se redes de malha muito fina na construção de canis ou de outras instalações exteriores, de modo a diminuir a presença de insectos no seu interior (Ciaramella & Corona, 2003).

A nível de ectoparasiticidas tópicos, os dois compostos que melhores resultados apresentaram em estudos já efectuados são a deltametrina e a permetrina (Killick-Kendrick

et al., 1997; David et al., 2001; Maroli, Mizzoni, Siragusa, D'Orazi & Gradoni, 2001; Reithinger, Teodoro & Davies, 2001; Manzillo et al., 2006).

As coleiras impregnadas com deltametrina (Scalibor ®) demonstraram não só uma redução na taxa de alimentação dos *Phlebotomus* (David et al., 2001; Reithinger et al., 2001), como também uma diminuição do seu tempo de vida, o que leva a uma diminuição da taxa de propagação da doença (Reithinger et al., 2001).

Este composto é de natureza lipofílica, pelo que demora algum tempo a atingir as secreções dérmicas em todo o corpo do animal, sendo recomendável a sua aplicação cerca de duas semanas antes da época de maior risco (Reithinger et al., 2001).

A apresentação sob a forma de coleiras tem a vantagem de ser de fácil utilização, e ter uma duração de acção de 4 a 6 meses. O aumento da taxa de sucesso é também devido ao facto de se diminuir o grau de esquecimento por parte dos proprietários. Uma única situação em que esta apresentação pode ser menos favorável é nos casos em que vive mais do que um animal no mesmo espaço, porque existe o risco das coleiras poderem ser arrancadas em consequência da interacção dos animais (Maroli et al., 2001).

A permetrina é comercializada sob a forma de spot-on (Pulvex ®, Advantix ®), em pequenas pipetas cujo conteúdo deve ser aplicado sobre a pele dos animais em 3 ou 4 pontos ao longo da sua coluna dorsal. Segundo indicações do fabricante, estas devem ser colocadas a cada 4 semanas, o que exige um maior grau de responsabilidade por parte dos proprietários.

A permetrina tem um efeito mais precoce do que a deltametrina, embora de menor duração (Reithinger et al., 2001). Por esta razão, a sua aplicação deve ser renovada mais frequentemente, estando indicada quando o risco de infecção é imediato.

Por ser apenas letal para os insectos que se alimentam no animal (Reithinger et al., 2001), é, em termos globais, menos eficaz no controlo da leishmaniose, porque apenas protege os animais em que o composto é aplicado.

Embora não existam formulações comerciais em Portugal com fentião, foram também obtidos bons resultados na forma de spot-on. O seu efeito tem uma duração mais longa que a da permetrina (Reithinger et al., 2001).

Como medida preventiva foi ainda proposto o uso de alopurinol, um fármaco leishmanioestático, ao longo do período de actividade do flébotomo (Moritz et al., 2001 citado em Saridomichelakis et al., 2005). No entanto, estudos realizados na Grécia, país com elevada incidência desta doença, revelaram que esta prática não é correcta, na medida em que não induz protecção e pode ainda contribuir para o aparecimento de estirpes de

Leishmania resistentes a este composto, que é de grande utilidade no seu tratamento (Saridomichelakis et al., 2005).

### 1.7. Terapêutica específica

Não existe nenhum tratamento de leishmaniose que permita alcançar a cura parasitológica. Os tratamentos disponíveis conseguem apenas atingir a cura clínica, com remissão dos sintomas e diminuição do título de anticorpos dos animais (Fayet, 2000; Baneth & Shaw, 2002; Ciaramella & Corona, 2003; Miró et al., 2008). A terapêutica não evita o aparecimento de recidivas, mas diminui o grau de infecciosidade dos cães para os vectores desta doença (Baneth & Shaw, 2002; Ciaramella & Corona, 2003; João et al., 2006). Sendo o cão o principal reservatório desta parasita, é importante garantir o seu tratamento, diminuindo a taxa de infecção em humanos.

A falta de eficácia do tratamento está associada à localização estritamente intracelular do parasita e à sua presença nalguns dos tecidos menos vascularizados do organismo, como a pele, o corpo vítreo e os tecidos queratinizados, o que dificulta a obtenção de doses terapêuticas no local da infecção, e consequentemente, o sucesso terapêutico (Ciaramella & Corona, 2003).

A decisão de tratar o animal deve ser ponderada, tanto pelo médico veterinário como pelo proprietário, tendo em conta o estado do animal, a disponibilidade do dono em assegurar uma terapêutica prolongada e dispendiosa e o relativo sucesso terapêutico (Fayet, 2000; Baneth & Shaw, 2002).

O veterinário deverá fazer uma boa avaliação do estado de saúde do animal, de modo a definir qual a melhor estratégia para cada caso. Uma vez que alguns dos fármacos utilizados são nefrotóxicos, deve-se ter uma particular atenção em relação ao funcionamento renal dos animais, antes de se iniciar a terapêutica (Fayet, 2000).

Ao proprietário deverão ser explicados os custos e os cuidados que o tratamento implica, bem como o facto de o animal não ficar parasitologicamente estéril (Denerolle & Bourdoiseau, 1999). Assim, este deverá ponderar a sua disponibilidade financeira, temporal e afectiva, uma vez que o animal poderá ter recidivas, o que implica a repetição do tratamento. Além disso, é aconselhável manter a terapêutica com fármacos leishmaniostáticos durante o resto da vida do animal, de modo a tentar diminuir a probabilidade de recidivas (Fayet, 2000).

A maior parte dos fármacos utilizados em cães são tradicionalmente utilizados em medicina humana (Fayet, 2000). Por esta razão, diversos autores advogam que se deveriam utilizar fármacos diferentes na leishmaniose canina, de modo a reduzir o aparecimento de estirpes de *Leishmania* resistentes, o que se pode traduzir num elevado risco para a saúde pública (Denerolle, 1996; Baneth & Shaw, 2002; Trotz-Williams & Gradoni, 2003; Pennisi et al., 2005; Miró et al., 2008).

A eutanásia dos animais positivos, prática comum no passado e ainda em uso em alguns países, como o Brasil (Miró et al., 2008), apenas se encontra reservada para casos excepcionais, em que possa haver grave risco de saúde pública, animais cujo estado de saúde não permita o tratamento com sucesso, por exigência do proprietário ou por recusa em efectuar o tratamento, uma vez que os tratamentos permitem atingir melhorias clínicas e qualidade de vida bastante satisfatórias (López, 2007).

#### 1.7.1. Antimoniais pentavalentes

Os dois compostos existentes – stibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina – são utilizados como tratamento de primeira escolha tanto da leishmaniose canina como da humana.

São fármacos leishmanicidas e o seu mecanismo de acção consiste na alteração das vias da glicólise,  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos e fixação do dióxido de carbono do parasita, bem como na inibição das enzimas glicossomais fosfofrutoquinase e fosfofenolpiruvato carboxiquinase, o que conduz à sua morte (Fayet, 2000).

Para o tratamento da leishmaniose canina, utiliza-se principalmente o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®, Merial) (Fayet, 2000; López, 2007). Em cães, este composto pode ser administrado por via endovenosa (que deverá ser reservada para animais hospitalizados), subcutânea ou intramuscular. As vias subcutânea e intramuscular são equivalentes em termos de biodisponibilidade, concentração plasmática máxima e eficácia. A via subcutânea é a mais comumente utilizada, tanto pela facilidade de administração, uma vez que permite que os próprios proprietários a realizem, como pela menor ocorrência de reacções adversas locais. A administração intramuscular provoca muitas vezes dor e inflamação no local da injeção (Fayet, 2000; Baneth & Shaw, 2002; Pennisi et al., 2005; López, 2007).

Os principais efeitos secundários deste composto são anorexia e outros sinais gastro-intestinais, apatia, estupor e inflamação no local da injeção. No caso da administração endovenosa pode ocorrer tromboflebite (Fayet, 2000; Baneth & Shaw, 2002; Pennisi et al.,

2005). Podem também ser detectadas alterações no traçado electrocardiográfico, como inversão ou aplanamento da onda T, mas são normalmente passageiras (Fayet, 2000). A maior parte destes sinais desaparecem após interrupção temporária do tratamento, não recorrendo quando este é retomado (Pennisi et al., 2005). No entanto, alguns canídeos desenvolvem reacções de intolerância por hipersensibilidade ao antimoniato, desenvolvendo hipertermia, apatia, sintomas gastro-intestinais, nomeadamente vómito e diarreia, e mialgia. Nestes animais o tratamento deve ser suspenso e optar-se por outra terapêutica. Por esta razão está recomendado iniciar o tratamento com uma dose baixa de antimoniato de N-metil-glucamina, procedendo-se depois ao ajuste gradual até atingir a dose recomendada (Fayet, 2000).

A morte dos parasitas leva a um aumento dos complexos imunes circulantes, o que pode agravar uma doença renal ou ocular pré-existente. Assim, a função renal deve ser correctamente avaliada antes e durante o tratamento, de modo a evitar que o estado do animal se agrave (Fayet, 2000). Quando a alteração renal é ligeira, não é impeditiva do tratamento ser realizado com antimoniato de N-metil-glucamina, nem influencia o prognóstico da animal (Pennisi et al., 2005).

Os tratamentos com este composto conduzem a melhorias clínicas significativas, bem como a uma redução na carga parasitária do animal, embora não consigam alcançar a cura parasitológica (Baneth & Shaw 2002; Pennisi et al., 2005). As recidivas são frequentes, sendo por isso comum que um animal precise de ser sujeito a mais do que um ciclo de tratamento. Contudo, os ciclos subsequentes devem ser evitados o mais possível, uma vez que o parasita se torna progressivamente mais resistente ao composto, podendo mesmo originar estirpes resistentes (Denerolle & Bourdoiseau, 1999; Baneth & Shaw 2002; Ciaramella & Corona, 2003; Trotz-Williams & Gradoni, 2003; Bourdoiseau, 2006).

Estão referidos diversos protocolos terapêuticos com o antimoniato de N-metil-glucamina:

- 150 mg/kg/dia por via subcutânea ou intramuscular em dois períodos de tratamento de 10 dias separados por um intervalo de 7 a 10 dias. Com este protocolo foi obtida uma taxa de recidivas de cerca de 75% (Fayet, 2000), contudo ainda não está determinada qual a taxa de remissão obtida com este protocolo.

- 100 mg/kg/dia por via subcutânea, durante 3 a 4 semanas. Com este protocolo foi obtida uma taxa de remissão clínica de 50 a 100%, mas uma taxa de recidivas de até 70%, havendo uma menor susceptibilidade do parasita ao composto nos tratamentos seguintes (Bourdoiseau, 2006).

- 50 mg/kg por via subcutânea, duas vezes por dia, em séries de 10 dias ou durante 30 dias, podendo ser repetido se necessário (Valladares, Alberola, Esteban & Arboix, 1996;

Denerolle & Bourdoiseau, 1999; Ciaramella & Corona, 2003). Embora este protocolo terapêutico esteja preconizado na bibliografia, não foram ainda determinadas as suas taxas de remissão e de recidivas.

- 75 mg/kg, duas vezes por dia, durante 21 a 30 dias, podendo ser prolongado por mais um mês se os resultados não forem satisfatórios (Baneth & Shaw, 2002; López, 2007). Também neste caso não foram ainda determinadas as taxas de remissão e de recidiva.

Estudos de farmacocinética desta molécula apontam para que a administração duas vezes por dia seja mais eficaz, uma vez que 80% desta é excretada por via renal nas primeiras 9 horas, ficando o composto em doses subterapêuticas a partir dessa altura. Assim, está recomendada a administração de doses menores de antimoniato de N-metil-glucamina, mas a intervalos de tempo inferiores, por exemplo, de 12 em 12 horas, de modo a minimizar o tempo em que as concentrações no organismo não estão dentro do intervalo terapêutico (Valladares et al., 1996; Denerolle & Bourdoiseau, 1999).

Tentou-se também a incorporação dos compostos pentavalentes em lipossomas, tendo-se obtido bons resultados em hamsters (Fayet, 2000) e em cães (Valladares et al., 2001). Esta incorporação permite que se atinjam concentrações terapêuticas de antimoniato de N-metil-glucamina nos tecidos afectados, havendo por isso uma menor taxa de recidivas nos animais tratados. Durante um ano não foram observadas recidivas e o proteinograma manteve o traçado normal. Situação diferente foi observada no grupo de animais tratados com antimoniato de N-metil-glucamina na apresentação comercial tradicional, em que apenas durante os três primeiros meses pós tratamento não se registaram alterações no proteinograma.

A incorporação destes compostos em lipossomas permite ainda reduzir a sua toxicidade (Valladares et al., 2001).

### 1.7.2. Alopurinol

É um fármaco leishmanioestático que actua na síntese proteica da *Leishmania*, incorporando-se no RNA do parasita, o que conduz à inibição do seu crescimento (Liste & Gascon, 1995; Denerolle & Bourdoiseau, 1999; Fayet, 2000).

Alguns dos efeitos secundários observados são eritema cutâneo, hipertermia, leucopénia, hepatite, sintomas gastro-intestinais, nomeadamente vômito e diarreia, e aumento da ALT (Fayet, 2000). Deverá avaliar-se regularmente as funções hepática e renal, uma vez que pode ocorrer xantínúria e formação de urólitos de xantina, principalmente se houver doença hepática concomitante (Denerolle & Bourdoiseau, 1999; Baneth & Shaw, 2002).

Embora alguns estudos antigos refiram a remissão da sintomatologia em animais tratados apenas com alopurinol, estudos mais recentes consideram que este fármaco, administrado como agente único, não é eficaz, pelo que não deve ser usado isoladamente (Denerolle & Bourdoiseau, 1999; Ciaramella & Corona, 2003).

### 1.7.3. Associação de antimoniato de N-metil-glucamina com alopurinol

Actualmente, este é o protocolo mais comumente utilizado no tratamento da leishmaniose canina (Fayet, 2000; Baneth & Shaw, 2002; Ciaramella & Corona, 2003; Miró et al., 2008).

Os dois fármacos têm acção sinérgica, com as acções de ambos a complementarem-se. O alopurinol, ao ser leishmanioestático, inibe o aumento do número de parasitas que resistiram ao tratamento com antimoniato de N-metil-glucamina, o que conduz à diminuição do número de recidivas. Esta combinação, embora aumente a taxa de remissão clínica, não aumenta a taxa de cura parasitológica (Denerolle, 1996; Baneth & Shaw, 2002).

Para além de aumentar a taxa de remissão e a diminuição do número de recidivas, a combinação destes fármacos diminui ainda a taxa de transmissão da doença, uma vez que diminui o número de macrófagos infectados na derme dos animais (João et al., 2006).

O tratamento combinado permite que a duração da administração de antimoniato de N-metil-glucamina seja menor, e por isso menos dispendioso, sendo o alopurinol bem tolerado a longo prazo e com baixos custos (Denerolle & Bourdoiseau, 1996; Denerolle, 1996; Baneth & Shaw, 2002).

Estão referidos diferentes protocolos terapêuticos:

- associado ao antimoniato de N-metil-glucamina, na dose diária de 100 a 150 mg/kg, o alopurinol é administrado na dose de 10 a 15 mg/kg, duas vezes por dia, durante 9 meses. Este protocolo diminui o número de recidivas e aumenta o tempo de sobrevivência (Fayet, 2000), não estando no entanto referidas as taxas de remissão e recidiva.

- associado ao antimoniato de N-metil-glucamina, na dose de 100 mg/kg/dia ao longo de 3 a 4 semanas, o alopurinol poderá ser usado na dose de 30 mg/kg/dia, ad aeternum. Este protocolo diminui o número de recidivas para 10%, e aumenta a taxa de remissão clínica para os 80 a 100%. No entanto, não é obtida a cura parasitológica destes animais, cujo PCR continua a ser positivo, sendo importante que mantenham o alopurinol durante toda a vida (Bourdoiseau, 2006).

- 100 mg/kg/dia de antimoniato de N-metil-glucamina durante 20 dias, em combinação com 15 a 30 mg/kg de alopurinol, duas vezes por dia, ad aeternum (Baneth & Shaw, 2002).

Embora este protocolo terapêutico esteja preconizado na bibliografia, não foram ainda determinadas as suas taxas de remissão e de recidivas.

- 100 mg/kg/dia de antimoniato de N-metil-glucamina até à resolução dos sinais clínicos, em combinação com 20 mg/kg de alopurinol, duas vezes por dia, durante 9 meses (Ciaramella & Corona, 2003). Não foram ainda determinadas as suas taxas de remissão e recidivas.

#### 1.7.4. Pentamidina

É um fármaco muito eficaz, contudo, é pouco utilizado devido à sua toxicidade e ao desenvolvimento de efeitos secundários, nomeadamente a formação de abscessos no local da injeção, dor, edema local, hipoglicémia, destruição hepática irreversível, nefrotoxicidade e hipotensão durante a administração (Fayet, 2000; Baneth & Shaw, 2002; Ciaramella & Corona, 2003). Em casos em que se opte pela sua utilização, os animais devem ser cuidadosamente controlados (Ciaramella & Corona, 2003).

A maioria dos cães tratados com este composto melhoram clinicamente, embora as recidivas sejam frequentes meses após o fim do tratamento (Baneth & Shaw, 2002).

Está indicada a sua administração por via intramuscular na dose de 4 mg/kg uma ou três vezes por semana, durante 6 semanas no mínimo, ou por via intraperitoneal, devendo neste caso ser diluído a 1/10.

#### 1.7.5. Aminosidina

É um aminoglicosídeo que actua por duas vias: através do bloqueio da síntese proteica e alterando a permeabilidade da parede citoplasmática do parasita (López, 2007).

Tem sido utilizado no tratamento da leishmaniose canina e humana. Apresente nefro e ototoxicidade, nas doses consideradas clínica e parasitologicamente eficazes (Baneth & Shaw, 2002; Ciaramella & Corona, 2003; Bourdoiseau, 2006; López, 2007), pelo que está contra-indicado em animais com nefropatia (Ciaramella & Corona, 2003).

Encontram-se referidos vários protocolos. Está recomendado o uso de 10 a 20 mg/kg/dia, por via intramuscular, durante 14 a 30 dias consoante a evolução do animal (Baneth & Shaw, 2002; López, 2007), ou 5 a 5.25 mg/kg por via subcutânea, duas vezes por dia, durante 3 semanas (Ciaramella & Corona, 2003; Bourdoiseau, 2006). Embora a taxa de remissão clínica seja elevada, com valores que variam entre os 33 e os 100%, verificou-se que na maioria dos animais ocorria recidiva 50 a 100 dias depois de terminada a terapia

(Bourdoiseau, 2006). Alguns autores verificaram que aumentando a dose para 40 mg/kg/dia, aumenta também o período de remissão dos sintomas até 4 anos (Baneth & Shaw, 2002). Assim, propuseram a utilização desta dose, embora alertando para um aumento da sua toxicidade

Foi proposta uma terapêutica combinada de aminosidina com antimoniais pentavalentes, contudo verificou-se que esta associação aumenta ainda mais a nefrotoxicidade destes fármacos (Baneth & Shaw, 2002).

#### 1.7.6. Anfotericina B

É um fármaco anti-fúngico, tendo-lhe sido reconhecida uma actividade contra determinados tipos de protozoários, onde se inclui a *Leishmania* spp. (Baneth & Shaw, 2002).

É utilizado principalmente no tratamento da leishmaniose humana, embora seja de segunda escolha, devido aos seus efeitos secundários, nomeadamente anafilaxia, trombocitopénia, anemia, dor generalizada, febre, flebite, convulsões, diminuição das funções renais tubulares e glomerulares e hipocalémia (Fayet, 2000; Ciaramella & Corona, 2003). Por esta razão, o seu uso é reservado aos casos de resistência aos antimoniais pentavalentes e aos pacientes imunodeprimidos, como acontece nos HIV positivos (Baneth & Shaw, 2002; Ciaramella & Corona, 2003).

Actua nos esteróis e fosfolípidos da membrana celular do parasita, alterando a sua permeabilidade. Embora tenha menor afinidade para o colesterol, componente da parede celular dos mamíferos, pode ter acção sobre as células tubulares renais, o que explica a sua nefrotoxicidade. Para este facto concorre também a vasoconstrição renal que esta molécula induz (Baneth & Shaw, 2002).

Em cães, deve ser administrada por via endovenosa lenta, durante o período de três meses. Os efeitos secundários incluem flebite, glomerulonefrite, hipertermia, anafilaxia e anorexia (Fayet, 2000). A função renal deve ser controlada regularmente, uma vez que o aumento da creatinémia exige a suspensão temporária do tratamento (Baneth & Shaw, 2002; Ciaramella & Corona, 2003).

Devido à longa duração da terapêutica, à via de administração e ao risco de nefrotoxicidade, este composto raramente é usado no tratamento da leishmaniose canina (Fayet, 2000; Baneth & Shaw, 2002).

### 1.7.7. Anfotericina B lipossomal

Constitui uma nova formulação de anfotericina B que foi criada com o objectivo de reduzir os efeitos secundários da molécula “convencional”.

A anfotericina foi incorporada em lipossomas, permitindo o componente lipídico que esta seja direccionada para o local da infecção, o que permite que reaja menos com o colesterol da parede celular, o que leva a uma diminuição os seus efeitos nefrotóxicos.

Devido ao seu elevado custo, e ao facto de ser um dos fármacos de primeira escolha na leishmaniose humana na Europa, não é utilizada em cães (Fayet, 2000; Baneth & Shaw, 2002; Ciaramella & Corona, 2003).

### 1.7.8. Miltefosina

É um fármaco leishmanicida, pertencente ao grupo das alcilfosfocolinas (Visher, Grousseau, & Médaille, 2007). É tóxico para as leishmanias e aumenta a activação dos linfócitos T e macrófagos, importantes na destruição do parasita. Leva ainda à formação de radicais livres de oxigénio e azoto, com efeitos microbicidas (Baneth & Shaw, 2002).

Já é usado há alguns anos na terapêutica da leishmaniose humana (Impavido®, Zentaris), tendo sido recentemente introduzida uma formulação específica para uso veterinário (Milteforan®, Virbac).

Nos estudos levados a cabo em humanos, verificou-se que a eficácia da miltefosina era semelhante à dos antimoniais pentavalentes. Pode ser particularmente útil quando há resistência aos antimoniais, uma vez que mostrou eficácia nesses casos (Sundar & Chatterjee, 2006; Mohebbi et al., 2007).

Tem a grande vantagem de ser administrada por via oral, o que facilita o correcto seguimento do tratamento por parte dos proprietários. No entanto, a sua utilização requer que os proprietários tenham conhecimento das regras de boa utilização do produto. Devem ser tomadas diversas precauções, tais como o uso de luvas durante a manipulação, evitar contacto com mucosas e evitar a sua manipulação por grávidas.

A miltefosina não tem excreção renal, pelo que pode ser usada em canídeos com a função renal comprometida. Deve ser administrada juntamente com o alimento, encontrando-se contra-indicada em animais anoréticos.

A dose diária é de 2 mg/kg, misturados na ração, durante 28 dias (Maynard, Woerly, Sanquer & Médaille, 2006; Vischer et al., 2007). Foi demonstrada a presença de

concentrações plasmáticas significativas após o final do tratamento. Estas vão diminuindo progressivamente durante cerca de 28 dias, o que aumenta o período terapêutico deste fármaco. No entanto, esta característica levanta alguns problemas em termos de surgimento de resistências, uma vez que as doses presentes no organismo podem ser subterapêuticas em determinados períodos (Sundar & Chatterjee, 2006).

Os principais efeitos adversos ocorrem a nível gastrointestinal, apresentando os animais vômito, diarreia e inapetência. Surgem principalmente durante os primeiros dias de tratamento, sendo na maior parte das vezes auto-limitantes (Sundar & Chatterjee, 2006; Mohebali et al., 2007; Vischer et al., 2007).

A miltefosina é teratogénica (Sundar & Chatterjee, 2006; Mohebali et al., 2007), não devendo por isso ser administrada a cadelas gestantes ou aleitantes.

Verificou-se que a administração de miltefosina associada ao alopurinol (Vischer et al., 2007), conduzia a resultados idênticos aos obtidos com a conjugação de antimoniato de N-metil-glucamina e alopurinol.

O alopurinol foi utilizado na dose de 10 mg/kg, duas vezes por dia, e a miltefosina a 2mg/kg/dia. Embora alguns animais tenham apresentado vômito e diarreia, esta sintomatologia foi transiente e auto-limitante (Vischer et al., 2007), tendo os animais apresentado uma evolução clínica favorável.

#### 1.7.9. Metronidazol e espiramicina

Um estudo de 2005 aponta esta combinação como sendo eficaz no combate à leishmaniose canina (Pennisi et al., 2005). Os animais foram medicados com 25 mg/kg de metronidazol e 150000 UI/kg de espiramicina por dia, por via oral, durante 90 dias.

Foram obtidos bons resultados em termos clínicos, não tendo sido, no entanto, obtida a cura parasitológica. Ao longo do tratamento verificou-se o aumento da amilase, embora não tenha havido nenhum caso de pancreatite.

Com base neste estudo, esta pode ser uma boa opção terapêutica para animais intolerantes ou com fraca resposta às terapêuticas convencionais, bem como quando é impraticável a utilização de terapêutica injectável (Pennisi et al., 2005).

#### 1.7.10. Imunoterapia

O objectivo da imunoterapia é encontrar substâncias que estimulem a componente celular da resposta imune, bem como aumentar a capacidade fagocítica dos macrófagos afectados (Ciaramella & Corona, 2003).

A imunoterapia é usada como coadjuvante da terapia convencional, de modo a melhorar a sua eficácia (Fayet, 2000).

Em humanos com leishmaniose, foi verificado que o uso de interferão-gama (IFN- $\gamma$ ) permite reduzir a dose de antimoniato necessária para inibir e eliminar o parasita, uma vez que aumenta a taxa de morte intracelular do parasita (Fayet, 2000).

A extrapolação do seu uso em cães, deve ter em atenção a sua especificidade pelo que se deve utilizar IFN- $\gamma$  canino para o seu tratamento (Fayet, 2000).

#### 1.8. Terapêutica de suporte

A maioria dos animais com leishmaniose necessita de tratamento de suporte durante ou previamente à terapêutica específica (Ciaramella & Corona, 2003).

A insuficiência renal, devida sobretudo a glomerulonefrite, é frequente nestes animais, e restringe os fármacos específicos que podem ser utilizados para tratar esta parasitose. Por ser conseqüente à deposição de complexos imunes no parênquima renal, alguns autores advogam o uso de corticosteróides no tratamento da insuficiência renal subaguda (Denerolle, 1996), embora esta terapêutica não seja consensual (Ciaramella & Corona, 2003; Félix et al., 2008).

É muitas vezes necessário instituir uma fluidoterapia agressiva, bem como adoptar uma dieta apropriada, pobre em proteína, fósforo e sódio, de modo a corrigir o equilíbrio electrolítico e a aumentar a excreção de compostos azotados (Ciaramella & Corona, 2003).

As lesões de pele, causadas frequentemente por bactérias oportunistas, fungos ou ácaros, devem ser tratadas consoante o agente presente. Nas piodermites, deve optar-se por antibioterapia durante 15 dias. Para os ácaros e fungos, está indicada a utilização de ivermectinas e itraconazol, respectivamente (Ciaramella & Corona, 2003).

Quando a anemia é severa, pode optar-se pelo uso esteroides anabólicos, como o decanoato de nandrolona, na dose de 1 a 2 mg/kg uma vez por semana, ao longo de 3 a 4

semanas, para estimular a actividade hematopoiética da medula óssea. Podem ainda ser administrados ácido fólico e vitaminas do complexo B, além de eritropoietina recombinante humana, na dose de 100 UI/Kg, 3 a 4 vezes (Ciaramella & Corona, 2003).

## 2. OBJECTIVOS DO ESTUDO

Este estudo teve como objectivo caracterizar a população e as alterações clínicas e laboratoriais em cães com leishmaniose no momento de apresentação, na zona de Lisboa.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Amostra

O presente estudo incluiu 158 cães com diagnóstico positivo para leishmaniose, que se apresentaram à consulta externa do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Técnica de Lisboa (UTL), entre 1999 e 2008.

Por ser um estudo retrospectivo, realizado com base em fichas clínicas, nem sempre foi possível recolher todos os dados em relação a cada animal.

Os animais em estudo foram caracterizados em relação às seguintes variáveis: sexo, raça, idade e local onde habitam, isto é interior ou exterior. Foram ainda recolhidos dados referentes à sintomatologia, hematologia e parâmetros bioquímicos de apresentação, meio de diagnóstico e mês de diagnóstico.

### 3.2. Métodos estatísticos

Para a caracterização dos animais em estudo os dados foram introduzidos num folha de cálculo Microsoft Office Excel ® 2003 e depois importados para o programa SPSS 16.0 for Windows ®, onde foi realizada uma análise estatística baseada em métodos descritivos.

## 4. RESULTADOS

Dos 158 animais em estudo, 105 eram machos (n=105/158; 66,5%), sendo os restantes 53 do sexo feminino (n=53/158; 33,5%).

A idade dos animais variou entre os 8 meses e os 20 anos, sendo a média de  $5,68 \pm 3,29$  anos. A maior parte dos animais encontram-se no intervalo entre os 2 e os 8 anos, estando aí incluídos 109 (n=109/137; 79,6%) animais. O grupo dos canídeos com mais do que 8 anos de idade comporta 19 (n=19/137; 12%) casos.

Dos 158 canídeos, 41 (25,9%) eram de raça indeterminada, distribuindo-se os restantes por 30 raças (tabela 1). Entre as raças mais frequentes encontram-se o Boxer, com 17 (10,8%) animais, o Rottweiler, com 14 (8,9%), o Labrador Retriever, com 12 (7,6%) e o Pastor Alemão, com 11 (7%). As raças portuguesas contaram com 10 animais, sendo 4 Perdigueiros Portugueses, 3 Cães d'Água Portugueses e 3 Serras da Estrela.

Raças	nº	%
Indeterminada	41	25,95%
Boxer	17	10,76%
Rottweiler	14	8,86%
Labrador Retriever	12	7,59%
Pastor Alemão	11	6,96%
Doberman	8	5,06%
Husky Siberiano	8	5,06%
Cocker Spaniel	6	3,80%
Perdigueiro Português	4	2,53%
Cão d'água	3	1,90%
Serra da Estrela	3	1,90%
American Staffordshire Terrier	2	1,27%
Dálmata	2	1,27%
Dog Alemão	2	1,27%
Epagneul Bretão	2	1,27%
Golden Retriever	2	1,27%
Pastor Belga	2	1,27%
Pittbull	2	1,27%
Pointer	2	1,27%
Samoyedo	2	1,27%
Schnauzer	2	1,27%
Shar-pei	2	1,27%
Beagle	1	0,63%
Border Collie	1	0,63%
Caniche	1	0,63%
Dog Argentino	1	0,63%
Flat Coated Retriever	1	0,63%
Leão da Rodésia	1	0,63%
Malamute do Alasca	1	0,63%
São Bernardo	1	0,63%
Setter Irlandês	1	0,63%

Tabela 1 - Raças presentes no estudo

Em 53 (n=53/158; 33,5%) fichas clínicas, foi possível determinar que os animais passavam grande parte do tempo ao ar livre, quer vivendo exclusivamente no exterior, quer tendo a possibilidade de estarem dentro e fora de casa. Em 4 (n=4/158; 2,5%) casos, os animais tinham sido resgatados da rua, o que implica uma vivência ao ar livre durante um período de tempo indeterminado.

Em termos de apresentação clínica, os sintomas mais frequentes foram emagrecimento (n=58/158; 36,71%), linfadenomegália (n=57/158; 36,08%), alopecia (n=43/158; 27,22%) e descamação (n=43/158; 27,22%) (tabela 2).

Síntoma	nº	%
Emagrecimento	58	36,71%
Linfadenomegália	57	36,08%
Alopecia	43	27,22%
Descamação	43	27,22%
Anorexia	40	25,32%
Mucosas pálidas	33	20,89%
Prostração	32	20,25%
Diarreia	30	18,99%
Úlceras cutâneas	30	18,99%
Vómito	29	18,35%
Claudicação	27	17,09%
Lesões oculares	25	15,82%
Polidipsia	23	14,56%
Epistáxis	18	11,39%
Poliúria	17	10,76%
Atrofia muscular	14	8,86%
Onicogribose	13	8,23%
Hiperqueratose nasal	12	7,59%
Úlceras das pontas das orelhas	11	6,96%
Nódulos cutâneos	7	4,43%
Lesões nas almofadinhas plantares	6	3,80%
Polifagia	5	3,16%

Tabela 2 - Sintomatologia apresentada pelos animais

A linfadenomegália foi detectada em 57 (n=57/158; 36,08%) animais. Destes, 27 (n=27/57; 47,37%) apresentavam-na de forma generalizada, em 18 (n=18/57; 31,58%) apenas se verificou o aumento dos linfonodos poplíteos, em 5 (n=5/57; 9,6%) dos retrofaríngeos e em 2 (n=2/57; 3,8%) exclusivamente dos pré-escapulares.

A diarreia foi detectada em 30 (n=30/158; 18,99%) animais. Destes, 10 (n=10/30; 33,33%) apresentavam diarreia hemorrágica ou melena, e 1 (n=1/30; 3,33%) diarreia mucosa.

Foram detectados lesões oculares em 25 (n=25/158; 15,8%) animais. As mais frequentes foram a conjuntivite, em 9 (n=9/25; 36%) animais e a uveíte, em 6 (n=6/25; 24%).

Foram ainda detectados casos de queratoconjuntivite (n=4/25; 16%) purulenta e seca, blefarite (3/25; 12%), úlceras corneanas (n=2/25; 8%) e episclerite imunomediada (n=1/25; 4%).

A polidipsia foi detectada em 23 (n=23/158; 14,56%) animais, enquanto que a poliúria só foi apresentada por 17 (n=17/158; 10,76%) canídeos.

Em 89 animais foi possível ter acesso ao resultado do hemograma efectuado no dia de apresentação. No entanto, não foi possível determinar correctamente todos os parâmetros, podendo o número de casos estudado variar.

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.

Parâmetro	n°	Valores fisiológicos		Valores baixos		Valores elevados	
		n°	%	n°	(%)	n°	(%)
Leucócitos	89	64	71,90%	16	18,00%	9	10,10%
Eritrócitos	89	30	33,70%	59	66,30%	-	-
Plaquetas	72	27	37,50%	44	61,10%	1	1,40%
Hemoglobina	89	36	40,50%	52	58,40%	1	1,10%
Hematócrito	89	27	30,40%	61	68,50%	1	1,10%
NNS	84	83	98,80%	-	-	1	1,20%
Neutrófilos segmentados	86	54	62,80%	8	9,30%	24	27,90%
Linfócitos	85	48	56,50%	32	37,60%	5	5,90%
Mónocitos	84	61	72,60%	13	15,50%	10	11,90%
Eosinófilos	84	40	47,60%	33	39,30%	11	13,10%
Basófilos	84	82	97,60%	-	-	2	2,40%

Tabela 3 – Valores hematológicos obtidos no dia de apresentação

Como pode ser observado na tabela, as alterações mais frequentes foram leucopénia (n=16/89; 18%), anemia (n=59/89; 66,3%) e trombocitopénia (n=44/72; 61,1%). Relativamente às diferentes linhas leucocitárias, as principais alterações registadas foram neutrofilia (n=24/86; 27,9%), linfopénia (n=32/85; 37,6%), monocitose (n=10/84; 11,9%) e eosinopénia (n=33/84; 39,3%).

BQ	n°	Valores fisiológicos		Valores baixos		Valores elevados	
		n°	%	n°	%	n°	%
BUN	77	40	51,90%	2	2,60%	35	45,50%
Crea	80	47	58,80%	3	3,80%	30	37,50%
ALT	68	52	76,50%	7	10,30%	9	13,20%
FAS	50	31	62,00%	4	8,00%	15	30,00%
PTs	48	27	56,20%	3	6,30%	18	37,50%
Alb	45	23	51,10%	22	48,90%	-	-
Glob	30	4	13,30%	3	10,00%	23	76,70%

Tabela 4 - Valores bioquímicos obtidos no dia de apresentação

Como se pode ver pela tabela 4, as principais alterações bioquímicas foram a nível dos parâmetros renais, BUN e Crea. Estes encontravam-se aumentados em 35 (n=35/77; 45,5%) e 30 (n=30/80; 37,5%) animais respectivamente.

Houve também alterações significativas em relação às globulinas, que se encontravam aumentadas em 23 (n=23/30; 76,7%) animais.

Neste estudo, foi possível apurar o meio de diagnóstico em 125 casos. Destes, 110 (n=110/125; 88%) foram diagnosticados exclusivamente através da titulação de anticorpos por IFI. Em 5 animais, correspondentes a 4% dos casos, o diagnóstico por IFI foi confirmado por outras técnicas, nomeadamente visualização directa do parasita em esfregaço de medula óssea e PCR de medula óssea.

Foram exclusivamente utilizadas técnicas de observação directa do parasita em 10 casos (n=10/125; 8%), quer em esfregaços de aspirado de medula óssea (n=4/125; 3,2%), gânglio linfático (n=4/125; 3,2%) ou do plano nasal (n=1/125; 0,8%), bem como em material de biópsia cutânea (n=1/125; 0,8%).

Em 131 animais foi possível determinar o mês de diagnóstico. Esta parasitose foi diagnosticada ao longo de todo o ano (tabela 5), sendo Julho o mês em que foram diagnosticados mais casos e Dezembro o de menor casuística.

Mês de diagnóstico	nº	%
Julho	18	13,74%
Junho	16	12,21%
Setembro	16	12,21%
Maiο	15	11,45%
Janeiro	11	8,39%
Agosto	11	8,39%
Outubro	9	6,87%
Novembro	9	6,87%
Fevereiro	8	6,11%
Março	7	5,34%
Abril	7	5,34%
Dezembro	4	3,05%

Tabela 5 - Distribuição dos casos por mês de diagnóstico

## 5. DISCUSSÃO

A Leishmaniose canina é uma doença muito frequente no nosso país, sendo a região metropolitana de Lisboa reconhecida pela sua alta incidência (João et al., 2006).

O Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária tem uma vasta casuística em clínica dos animais de companhia, recebendo animais de toda região de Lisboa. Por esta razão, reúne condições excelentes para a realização de um estudo cujos objectivos são a caracterização da população e do quadro clínico de canídeos com leishmaniose nesta região do país.

Neste trabalho, a maioria dos animais em que foi realizado o diagnóstico de leishmaniose eram machos, o que está de acordo com o descrito anteriormente (Slappendel, 1988; Denerolle, 1996; João et al., 2006; Miranda, Roura, Picado, Ferrer & Ramis, 2008). Outros autores referem que não existe predisposição de sexo (Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella & Corona, 2003).

A maior predominância de animais do sexo masculino neste estudo pode estar ligada ao facto de estes, por terem geralmente um temperamento mais agressivo e territorial, e serem de maior porte comparativamente aos do sexo feminino, serem mais frequentemente utilizados como animais de guarda, permanecendo por isso mais tempo no exterior. Contudo, uma vez que o número total de machos e fêmeas presentes no Hospital Escolar da FMV não foi estabelecido, é também possível que a maior frequência de machos se deva apenas a estes se encontrarem em maior número na população.

Na maior parte dos animais o diagnóstico de leishmaniose teve lugar na faixa etária entre os 2 e os 8 anos. É incomum encontrar animais com menos de um ano de idade com expressão clínica desta parasitose (Kontos & Koutinas, 1993), tendo num estudo envolvendo 137 canídeos sido diagnosticado apenas um animal com 8 meses. Este facto pode dever-se ao prolongado período de incubação da leishmaniose, que pode variar desde poucos meses até vários anos (Kontos & Koutinas, 1993; Trotz-Williams & Gradoni, 2003). Por outro lado, os animais jovens são mais frequentemente resguardados no interior das habitações, o que também pode contribuir para este facto, uma vez que diminui a probabilidade de infecção através da picada do insecto vector (Ciaramella & Corona, 2003). Verificámos que esta doença tem também expressão nos animais geriátricos. É possível que alguns destes animais já estivessem infectados há algum tempo, mas que se encontrassem numa situação de equilíbrio com o parasita, pelo que não apresentavam sintomatologia perceptível. Efectivamente, em animais mais velhos, o desenvolvimento da leishmaniose parece estar relacionado com o surgimento de outras doenças concomitantes, que contribuem para uma quebra da imunidade, alterando a relação de equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro (Ferrer, 2002; Miranda et al., 2008). No nosso estudo, 31,6% (6) dos animais geriátricos tinham concomitantemente outras doenças, como dirofilariose (2), neoplasias (1) e febre da carraça (3).

Os animais de raça indeterminada foram os mais frequentemente diagnosticados. Isto pode ser devido ao facto destes se encontrarem em maior número na população total do Hospital Escolar da FMV, uma vez que esta não foi determinada. Dentro dos animais de raça pura, os animais mais frequentemente encontrados pertencem a raças de grande porte, tal como já tinha sido referido noutros estudos (Denerolle, 1996). Algumas das raças com maior expressão neste estudo, como o Boxer, o Pastor Alemão e o Rottweiler, já tinham sido referidas como tendo maior prevalência em populações com leishmaniose (Miranda et al., 2008). Devido ao seu porte, estes animais passam frequentemente mais tempo no exterior, o que pode explicar a sua elevada frequência (Amusategui et al., 2003). Além disso, foi provado que a genética tem um papel relevante na susceptibilidade dos canídeos à doença, havendo determinados genes que predispõem ao seu desenvolvimento. Assim, algumas raças, como o Boxer, são mais susceptíveis de desenvolver doença clínica, e fazem-no mais precocemente que outras (Baneth et al., 2008; Miranda et al., 2008). As raças portuguesas incluídas neste estudo são também de animais de grande porte e tradicionalmente associados a actividades ao ar livre, como a caça no caso dos Perdigueiros Portugueses e o pastoreio e a guarda no caso dos cães Serra da Estrela.

Apesar de alguns autores referirem a não predisposição de raça (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella & Corona, 2003), a verdade é que nos seus trabalhos as raças

de pequeno porte encontravam-se pouco representadas, o que está de acordo com os nossos resultados. Esta situação foi também recentemente encontrada por outros autores (Miranda et al., 2008), e pode ser justificada pelo facto de estas raças serem mais frequentemente mantidas no interior da habitação, havendo por isso menor possibilidade de infecção.

Está provado que determinadas raças autóctones de regiões em que a leishmaniose é endémica, como o Podengo Ibicenco, são resistentes a esta parasitose, devido ao tipo de resposta imunitária que desenvolvem (Ferrer, 2002). Nenhum estudo deste género foi desenvolvido com as raças portuguesas, também elas originárias de zonas endémicas. Assim, não se pode tirar elações sobre a frequência de leishmaniose nestas raças, uma vez que se desconhece o seu número. Estudos envolvendo estas raças deveriam ter lugar com o objectivo de esclarecer se existe por parte de alguma delas algum grau de resistência ao parasita.

No nosso estudo, verifica-se uma maior frequência de animais com pêlo curto e médio, o que pode ser explicado pela maior predominância de raças que possuem este tipo de pelagem. O comprimento do pêlo poderá estar associado à infecção, uma vez que o flébotomo terá maior facilidade em atingir a derme de um cão com pêlo curto do que a de um de pêlo comprido. É muito difícil confrontar este dado com o descrito na bibliografia, uma vez que, que tenhamos conhecimento, só num estudo é que este parâmetro foi introduzido (Kontos & Koutinas, 1993).

A maioria dos canídeos com leishmaniose apresenta sintomatologia inespecífica (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella & Corona, 2003). Neste estudo, os sintomas mais frequentes foram emagrecimento, linfadenomegália, alopecia e descamação furfurácea. A frequência destes sintomas já foi previamente referida (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Denerolle, 1996; Fayet, 1999; Amusategui et al., 2002; Ciaramella & Corona, 2003).

A frequência de cada sintoma por nós obtida nem sempre é concordante com os dados apresentados anteriormente. No entanto, e uma vez que este estudo foi realizado a partir de fichas clínicas de um Hospital com elevado número de médicos veterinários, deve-se ter em conta que a recolha dos sintomas depende da sensibilidade de cada um, sendo para além disso, um exercício subjectivo. Assim, o preenchimento de uma ficha clínica depende do clínico, do proprietário do animal, nomeadamente as informações que fornece, e ainda do carácter do animal, isto é, ser mais ou menos colaborante.

No nosso estudo, a maioria dos animais apresentou-se em mau estado geral, perda de peso e prostração, o que está de acordo com a bibliografia (Slappendel, 1988; Denerolle, 1996; Trotz-Williams & Gradoni, 2003; Baneth et al., 2008). Na maior parte dos casos, o emagrecimento estava ligado a anorexia, sintoma manifestado por 25% dos canídeos. Para o aparecimento deste sintoma contribuem a insuficiência renal e outros sintomas gastrointestinais a ela associados, como o vómito (Slappendel, 1988).

No nosso trabalho, 36% dos casos apresentavam linfadenomegália. Este número é muito inferior ao referido noutros estudos, onde este sintoma foi detectado em 70 a 90% dos animais (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Denerolle, 1996; Amusategui et al., 2002; Ciaramella & Corona, 2003). Esta discrepância deve-se provavelmente ao facto de o nosso estudo ter sido realizado retrospectivamente, com base em fichas clínicas, e não a partir de um formulário previamente definido. Alia-se também o facto deste sintoma ser tão comum, que por vezes poderá ser omitido pelos clínicos no momento de escrever as fichas clínicas.

A linfadenomegália deve-se à reacção do sistema mononuclear-fagocitário aos antígenos do parasita (Koutinas et al., 1999). Histologicamente, observa-se um aumento do número e tamanho dos folículos linfóides bem como a hiperplasia e hipertrofia dos macrófagos medulares. A carga parasitária dos linfonodos parece não estar interligada com a severidade das lesões noutros órgãos (Baneth et al., 2008).

A percentagem de casos que apresentavam epistáxis é semelhante à que vem descrita na bibliografia (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Denerolle, 1996). A maioria destes animais apresentava titulações de anticorpos elevadas, podendo este sintoma estar relacionado com a deposição de complexos imunes nas paredes dos vasos sanguíneos, com sua subsequente fragilização (Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella & Corona, 2003). A epistáxis pode também ser devida a alterações da hemostase, rinite piogranulomatosa ou linfoplasmocítica, ulceração da mucosa e trombocitopénia (Baneth et al., 2008). Em animais com leishmaniose podem estar presentes alterações primárias e secundárias da hemostase, como disfunção plaquetária devido a alterações na sua agregação, trombocitopénia, diminuição da actividade dos factores de coagulação e fibrinólise (Baneth et al., 2008).

Num dos casos a epistáxis era recorrente e de grande gravidade, tendo o dono optado pela eutanásia do animal. Quando não se consegue controlar este sintoma, o estado clínico dos animais pode agravar-se muito rapidamente (Baneth et al., 2008), o que pode justificar a opção pela eutanásia em muitos destes cães.

Relativamente à atrofia muscular, esta foi observada em 9% dos casos. A atrofia a nível dos músculos da cabeça, dando o característico aspecto de “cabeça de velha” (Kontos &

Koutinas, 1993; Fayet, 1999), dá ao animal um ar envelhecido, que constitui frequentemente o estímulo iatrotópico, uma vez que é um dos sintomas mais perceptíveis pelos proprietários.

A atrofia muscular está associada ao aparecimento de polimiosite crónica, caracterizada pela infiltração de formas amastigotas do parasita, vasculite neutrofílica e complexos imunes no tecido muscular (Baneth et al., 2008).

A claudicação apresentada pelos animais pode dever-se à atrofia muscular, mas também ao facto dos animais apresentarem onicogrifose e lesões nas almofadinhas plantares, como descrito na bibliografia (Kontos & Koutinas, 1993). Estes sintomas podem causar desconforto ao andar, apresentando os animais claudicação ou mesmo recusa em locomoverem-se, se as lesões afectarem os 4 membros.

Pode ainda estar presente poliartrite, devida à deposição de imunocomplexos no líquido sinovial (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Baneth, 2008), o que leva também ao aparecimento de claudicação. Os ossos afectados apresentam lesões proliferativas intramedulares e periósticas, sendo possível isolar amastigotas de *Leishmania* em material de biópsia óssea (Slappendel, 1988; Baneth et al., 2008).

No nosso estudo, dos 27 animais que apresentavam claudicação, 4 (14,8%) tinham atrofia muscular marcada, 6 (22,2%) onicogrifose e apenas 1 (3,7%) lesões nas almofadinhas plantares. A presença simultânea de dois ou mais destes sintomas estava patente em 3 animais.

Estando muitas vezes esta doença associada a comprometimento renal, os animais manifestaram sintomatologia como poliúria, polidipsia, vômito, diarreia e anemia (Slappendel, 1988; Ciaramella & Corona, 2003).

Neste estudo, a percentagem de animais com polidipsia é ligeiramente superior à de animais com poliúria. Geralmente estas duas manifestações estão interligadas, uma vez que fisiologicamente o aparecimento de uma tem uma influência directa na outra.

Esta diferença pode dever-se ao facto de os animais conseguirem manter as frequências de micção inalteradas, não exigindo dos proprietários uma maior frequência de passeios nem ocorrendo micções em locais indesejados. Assim, estes podem não se aperceber de uma maior quantidade de urina produzida. Além disso, alguns dos animais viviam no exterior, não controlando os proprietários os actos de micção, e por isso não se apercebendo da sua maior frequência. A não ser em animais que vivem em canis exteriores, ou nos que têm acesso livre à água, a polidipsia pode ser mais facilmente notada pelos proprietários, uma vez que os animais exigem mais vezes o enchimento das taças ou procuram fontes de abeberamento alternativas.

O vômito pode estar relacionado com falha renal e consequente subida do nível de ureia sanguínea, mas também com alterações gastrointestinais. Os valores obtidos no nosso estudo não estão de acordo com nenhum dos estudos anteriormente publicados, mas também entre eles não há concordância, sendo os valores muito variáveis (Slappendel, 1988; Amusategui et al., 2002). No entanto, os valores obtidos por nós são semelhantes aos obtidos para diarreia, polidipsia e poliúria, o que pode sugerir que estes sintomas se encontram interligados.

A diarreia apresentada pelos animais pode estar muitas vezes ligada a insuficiência renal. O aumento dos níveis de ureia leva ao aparecimento de ulcerações gastrointestinais, o que pode provocar, consoante o local das mesmas, diarreia hemorrágica e melena. (Slappendel 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Denerolle, 1996; Fayet, 1999; Baneth et al., 2008).

Os animais podem também apresentar diarreia mucosa, devida a colite por infiltração da mucosa intestinal por amastigotas do parasita e por células inflamatórias (Ciaramella & Corona, 2003).

Os valores hematológicos e bioquímicos séricos, embora apresentem limitações no que respeita ao diagnóstico desta doença, são de grande utilidade na avaliação do estado clínico do animal e da extensão das lesões existentes, podendo dar indicações sobre o prognóstico do animal (Ikeda et al., 2002 e Reis et al., 2006, citados em Costa-Val et al., 2007).

Relativamente às alterações hematológicas, os resultados dos diversos estudos nem sempre são semelhantes (Fayet, 1999; Strauss-Ayali & Baneth, 2000; Amusategui, et al., 2003; Bourdoiseau, 2006; Baneth et al., 2008).

De acordo com os diferentes estudos, a frequência de anemia varia entre os 30% (Amusategui, et al., 2003) e os 74% (Strauss-Ayali & Baneth, 2000), havendo ainda autores que referem a sua presença em todos os animais sintomáticos (Baneth et al., 2008). Esta é geralmente ligeira a moderada, podendo contudo tornar-se grave devido às hemorragias frequentes e à trombocitopenia que muitas vezes lhe está associada (Fayet, 1999; Ciaramella & Corona, 2003; Trotz-Williams & Gradoni, 2003). No contexto desta doença, a anemia pode ser devida a hemorragias por alteração da hemostase, hemólise, inflamação generalizada, insuficiência renal e hipoplasia ou aplasia medular (Anosa & Idowu, 1983; Slappendel & Greene, 1990 e Koutinas et al., 1999, citados em Costa-Val et al., 2007). A presença de amastigotas de leishmania na medula óssea leva à sua infiltração por linfócitos, células plasmáticas e macrófagos, diminuindo a produção de eritrócitos, o que torna a anemia não regenerativa. A insuficiência renal leva ao aumento dos níveis séricos de ureia, que tem acção tóxica sobre os eritrócitos, diminuindo o seu tempo de semi-vida. Além disso,

a síntese de eritropoietina está também comprometida, havendo menor estímulo medular (Costa-Val et al., 2007).

No nosso estudo, 66% dos animais estavam anémicos, e cerca de 61% apresentava trombocitopénia, o que está em concordância com a bibliografia (Strauss-Ayali & Baneth, 2000; Baneth et al., 2008).

Neste estudo, cerca de 18% dos animais apresentaram-se leucopénicos, com neutrofilia em 27,9% dos casos, linfopénia em 37,6% e eosinopénia em 39,3%. A monocitose está presente em 11,9% dos animais.

A leucopénia poderá dever-se à diminuição das linhas linfocíticas e eosinocíticas. Na maioria dos animais com leishmaniose, está presente linfadenomegália. Esta está associada, em parte, ao aumento do seu pool de linfócitos, o que pode explicar a diminuição do número desta linha celular em circulação (BSAVA, 2005; Baneth, 2008). Dos 32 animais que apresentaram linfopénia, em 17 (53%) foi registada a presença de um ou mais linfonodos aumentados, o que corrobora os dados bibliográficos. A linfopénia pode também estar relacionada com a severidade da doença clínica, devido ao carácter imunossupressivo da leishmaniose canina (Costa-Val et al., 2007).

O aumento do número de neutrófilos em circulação foi descrito em diversos estudos (Slappendel, 1988; Ferrer, 2002; Amusategui et al., 2003; Bourdoiseau, 2006). Este achado laboratorial tem sido associado às fases iniciais da doença (Ferrer, 2002; Amusategui et al., 2003; Bourdoiseau, 2006), uma vez que nestas está presente uma reacção inflamatória aguda (BSAVA, 2005). Além disso, o desenrolar desta doença está associado à produção de elevadas quantidades de anticorpos, e às alterações tissulares por eles produzidas, o que está também associado ao aumento do número de neutrófilos em circulação (BSAVA, 2005). Embora outros autores tenham descrito um ligeiro desvio à esquerda da linha neutrofílica (Slappendel, 1988; Fayet, 1999), neste estudo tal só foi verificado num animal (1,2%).

Os monócitos são os precursores sanguíneos dos macrófagos. Na leishmaniose estes últimos desempenham um papel fundamental no desenrolar da doença, sendo assim perceptível que o número de monócitos em circulação aumente, de modo a tentar compensar a destruição de macrófagos (BSAVA, 2005).

Em termos gerais, os dados obtidos estão de acordo com os referidos na bibliografia (Slappendel, 1988; Fayet, 1999; Amusategui, et al., 2003; Ciaramella & Corona, 2003; Trotz-Williams & Gradoni, 2003). Contudo, é difícil compará-los com outros estudos, uma vez que a maioria deles correlaciona as alterações hematológicas com as diferentes fases da doença. Como o objectivo do nosso trabalho foi avaliar as alterações analíticas no momento do diagnóstico, não foi possível determinar qual o estadió da doença, uma vez que nesta fase ainda não era conhecido o proteinograma.

Como tal, é impossível determinar se os animais estavam numa fase inicial, o que poderia explicar a neutrofilia, de acordo a bibliografia (Ferrer, 2002; Amusatogui et al., 2003; Bourdoiseau, 2006), ou numa fase mais avançada, o que daria origem ao aparecimento de leucopénia e linfopénia (Fayet, 1999; Ferrer, 2002; Amusatogui et al., 2003; Trotz-Williams & Gradoni, 2003).

No Hospital Escolar, nos animais em que, na apresentação, se suspeite de leishmaniose, geralmente requisita-se um painel bioquímico, que inclui parâmetros renais e hepáticos, proteínas totais e albumina. O valor das globulinas é alcançado através da diferença entre as proteínas totais e a albumina. Estes parâmetros permitem avaliar a dinâmica das proteínas sanguíneas, contudo fornecem menos informações que o proteinograma. Assim, embora seja possível verificar se o animal tem hiperglobulinémia, não se consegue determinar quais os tipos de globulinas que se encontram aumentados, não se podendo determinar o estadió da doença.

A insuficiência renal é apontada como a principal causa de morte em canídeos com leishmaniose (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Fayet, 1999; Ciaramella & Corona, 2003; Trotz-Williams & Gradoni, 2003). É defendido que existe lesão renal em praticamente todos os animais infectados, embora só se desenvolvam manifestações clínicas e séricas quando a maioria dos nefrónios se encontra afectada, em fases avançadas da doença (Baneth et al., 2008). Esta alteração pode progredir de uma proteinúria assintomática até síndrome nefrótico ou mesmo insuficiência renal crónica com glomerulonefrite, nefrite tubulo-intersticial e amiloidose (Baneth et al., 2008; Félix et al., 2008). A glomerulonefrite está associada à deposição de complexos imunes no tecido renal (Baneth et al., 2008).

As alterações renais traduzem-se, em termos bioquímicos, no aumento da ureia e creatinina. No nosso estudo, 45,5% dos animais apresentavam valores aumentados de ureia, 37,5% aumento da creatinina sérica, e 31,3% aumento de ambos os valores, o que sugere que teriam patologia renal em curso. Estes animais apresentaram sintomatologia decorrente do comprometimento renal, como polidipsia (32%), poliúria (24%), vómito (48%), anorexia (44%) e anemia (84%).

Em relação aos parâmetros hepáticos, o valor da ALT apenas se encontrava ligeira a moderadamente elevada em 13% dos animais. Os valores da FAS estavam aumentados em 15 (30%) animais. Estes dados no seu cômputo sugerem uma alteração hepática moderada. Efectivamente, as lesões hepáticas associadas à leishmaniose, não são severas, retornando os valores hepáticos ao normal após o tratamento (Ciaramella & Corona, 2003).

Neste estudo, verificou-se que a maioria dos animais apresentava hiperproteinémia, hipoalbuminémia e hiperglobulinémia, como vem descrito na bibliografia (Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella & Corona, 2003).

A hiperproteinémia é causada pelo aumento das globulinas sanguíneas, que ocorre quando o animal desenvolve uma resposta imunitária de tipo humoral, com produção de anticorpos pelos linfócitos B (Kontos & Koutinas, 1993; Slappendel, 1995; Fayet, 1999; Ciaramella & Corona, 2003; Félix et al., 2008). Para o aumento os níveis séricos de proteínas concorrem, principalmente, as  $\beta$  e  $\gamma$  globulinas, mantendo-se as  $\alpha$  globulinas dentro dos limites fisiológicos (Kontos & Koutinas, 1993; Fayet, 1999; Ciaramella & Corona, 2003; Trotz-Williams & Gradoni, 2003; Amusategui et al., 2003; López, 2007). Os anticorpos levam ao desenvolvimento clínico da infecção, uma vez que muitos são auto-anticorpos, acabando por provocar as lesões características da doença, em vez de serem eficazes no seu controlo. Os anticorpos permitem ainda a entrada de parasitas nos macrófagos, favorecendo desta modo a sua disseminação no organismo (Slappendel, 1995; Fayet, 1999).

No nosso estudo, dos 23 animais que apresentavam hiperglobulinémia, foi possível determinar o título IFI em 12, apresentando todos eles titulações acima dos 1/160. 7 destes animais apresentavam titulações acima dos 1/320, um valor bastante elevado e que explica a hipergamaglobulinémia.

A hipoalbuminémia está ligada a má nutrição, doença hepática ou nefropatia com perda de proteína (Ikeda-Garcia et al., 2007; Baneth et al., 2008; Félix et al., 2008). No nosso estudo, dos 22 animais que apresentavam hipoalbuminémia, 10 (45,5%) estavam anoréticos, e 15 (68,2%) apresentavam os parâmetros renais alterados, o que sugere doença renal associada. Os parâmetros hepáticos estavam alterados em 6 animais (27,3%), sugerindo assim que a insuficiência hepática pode ter contribuído para o aparecimento da hipoalbuminémia, embora não tenha sido o factor predominante.

Existem diversos métodos para diagnosticar esta parasitose. Neste estudo, a grande maioria dos casos foi diagnosticado através de IFI, o que reflecte a realidade em Portugal, uma vez que este é o meio de diagnóstico utilizado como primeira abordagem. Geralmente, é aceite que o diagnóstico é positivo a partir da titulação de 1/80 (Ciaramella & Corona, 2003), embora nestes casos se aconselhe a repetição da titulação após 4 a 6 semanas ou a utilização de outros métodos para confirmação. Em 5 casos, em que os resultados serológicos foram duvidosos, mas clinicamente suspeitos, foram efectuados outros testes, tendo-se optado por colher medula óssea para observação de esfregaço e para PCR.

Embora a observação do parasita em esfregaço seja considerado o meio de diagnóstico mais fiável (Ferrer et al., 1995; Fayet, 1999; Ciaramella & Corona, 2003), este pode ser moroso e difícil, uma vez que, quando as cargas parasitárias são muito baixas, pode ser difícil identificar os parasitas. O PCR preenche esta lacuna, uma vez que, mesmo com

cargas parasitárias muito baixas, permite fazer o diagnóstico, embora este não seja quantitativo (Manna et al., 2007). O PCR é então um meio de diagnóstico muito útil em casos clinicamente suspeitos, e negativos através de outros métodos, muito embora o elevado custo não permita a sua utilização de forma rotineira (Fayet, 1999; Trotz-Williams & Gradoni, 2003), o que explica a sua baixa utilização no nosso estudo.

Deve-se, no entanto, ter em atenção que o facto do animal ser positivo a qualquer um dos métodos de diagnóstico não significa que esteja doente, apenas que está infectado e é portador do parasita. O desenvolvimento da doença clínica depende da interacção entre o hospedeiro e o parasita, havendo muitos animais infectados que não apresentam doença clínica (Miró et al., 2008). A susceptibilidade dos animais é influenciada por factores genéticos, e por outros não genéticos, como estado nutricional, infecções concomitantes e grau de parasitismo, virulência da estirpe de *Leishmania* e exposição prévia a este parasita (Baneth et al., 2008). Assim, os achados laboratoriais devem ser sempre interpretados tendo em conta o exame clínico do animal (Fayet, 1999; Ciaramella & Corona, 2003), não se devendo valorizar um resultado positivo num animal assintomático nem se devendo descartar a hipótese de leishmaniose num animal fortemente suspeito, mas cujo resultado laboratorial é negativo.

No nosso trabalho, esta parasitose foi diagnosticada durante todo o ano, embora o insecto transmissor tenha actividade máxima durante os meses de Primavera e Verão (Ciaramella & Corona, 2003). Este facto deve-se ao prolongado período de incubação da doença, que pode variar de meses a vários anos, não havendo por isso uma relação directa entre o período de infecção e o aparecimento de doença clínica.

O facto da distribuição do número de casos não ser constante ao longo do ano pode ser explicado pelo horário de funcionamento do Hospital Escolar. Durante os meses de Março e Abril, correspondentes à Páscoa, e Dezembro, correspondente ao Natal, o Hospital faz pausas no seu funcionamento, o que pode explicar o menor número de casos. O mesmo se passa durante o mês de Agosto, em que o Hospital apenas está em funcionamento durante o período da manhã. Assim, o menor número de diagnósticos nesses meses pode estar relacionado com o menor número de consultas em geral, e não com um menor número de casos de leishmaniose.

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo, os animais mais afectados foram animais do sexo masculino, adultos e maioritariamente de raças de grande porte. Estes 3 factores podem predispor os animais a viverem mais no exterior, estando por isso mais sujeitos à picada do insecto vector, o que os torna uma população em risco.

O facto de a maior parte dos animais diagnosticados ser de raça indeterminada pode espelhar a sua elevada frequência como animais de companhia no nosso país.

O diagnóstico foi realizado maioritariamente em animais adultos, ou seja, entre os 2 e os 8 anos, o que pode ser explicado pelo longo período de incubação da doença, que pode variar de meses a anos. Assim, é muito infrequente encontrar animais com menos de 2 anos com sintomatologia clínica desta doença.

A sintomatologia apresentada é inespecífica, com sintomas gerais e cutâneos na maior parte dos animais. Devido a este facto, deve-se sempre incluir a hipótese de leishmaniose em casos de doença arrastada, de etiologia desconhecida.

O meio de diagnóstico mais utilizado foi a IFI, o que está de acordo com a realidade do nosso país. Apenas alguns casos foram diagnosticados por outros meios, e muitas vezes apenas para confirmar diagnósticos duvidosos obtidos por IFI.

O diagnóstico foi efectuado durante todo o ano, o que se pode explicar pelo período de incubação da doença, apesar do vector ter maior actividade nos meses quentes.

A Leishmaniose canina é uma zoonose com elevada prevalência em Portugal, sendo importante caracterizar a população atingida e conhecer a sintomatologia e as alterações laboratoriais aquando da apresentação. Para que seja possível o diagnóstico numa fase precoce da doença é necessário que os médicos veterinários de animais de companhia estejam cientes dos quadros de apresentação.

## BIBLIOGRAFIA

- Amusategui, I., Sainz, A., Rodriguez, F. & Tesouro, M.A. (2003). Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis, *European Journal of Epidemiology*, 18, 147-156.
- Baneth, G. & Shaw, S.E. (2002) Chemotherapy of canine leishmaniosis, *Veterinary Parasitology*, 106 (4), 315-324
- Baneth, G., Koutinas, A, Solano-Gallego, L., Patrick Bourdeau, P. & Lluís Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one, *Trends in Parasitology*. Acedido em Novembro de 2008, a partir do site PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- Bourdoiseau, Pr.G. (2006). Update on treatment and prevention of the canine leishmaniosis in Europe. In *Proceedings of the Merial 4<sup>th</sup> Parasitology-Arthropod Borne Disease Symposium*, Zagreb, Croatia, 4-6 October.
- British Small Animal Veterinary Association (2005). *BSAVA manual of canine and feline clinical pathology* (2<sup>nd</sup> ed.) Gloucester:BSAVA
- Ciaramella, P. & Corona, M. (2003). Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects, *Compendium*, 25, 358-368.
- Ciaramella, P. & Corona, M. (2003). Canine leishmaniasis: therapeutic aspects, *Compendium*, 25, 370-375.
- Costa-Val, A.P., Cavalcanti, R.R., Gontijo N.F., Michalick, M.S.M., Alexander, B., Williams, P. & Melo, M.N. (2007). Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity, *The Veterinary Journal*, 174, 636-643.
- David, J.R., Stamm, L.M., Bezerra, H.S., Souza, R.N., Killick-Kendrick, R. & Lima, J.W.O. (2001). Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*, *Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 96 (6), 839-847.
- Denerolle, Ph. (1996). Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas), *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 31, 137-145.
- Denerolle, P. & Bourdoiseau, G. (1999). Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases), *J. Vet. Inter. Med*, 13, 413-415.
- Fayet, G. (1999). Canine leishmaniasis in Europe; Part 2: Pathogenesis – Clinical signs – Diagnosis, *Merial Biological Technical Bulletin*.
- Fayet, G. (2000). Canine leishmaniasis in Europe; Part 3: Treatment, *Merial Biological Technical Bulletin*.
- Félix, N., Mouro, S., Vilela, C.S., Peleteiro, M.C., Ferreira, A.J.A & Niza, M.M.R.E. (2008). Canine leishmaniasis with nephrotic syndrome and aortic and caudal vena cava thromboembolism, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(5), 526-531.
- Ferrer, L., Aisa, M.J., Roura, X. & Portús, M. (1995). Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis, *The Veterinary Record*, 136, 514-516.

- Ferrer, L. (2002). Canine leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In Proceedings of the 27<sup>th</sup> annual world congress of the World Small Animal Veterinary Association, Granada, Spain, 3-6 October.
- Gough, A. (2007). Differential diagnosis in small animal medicine. (1<sup>st</sup> ed.) Oxford: Blackwell Publishing. pp 328-335.
- Ikeda-Garcia, F.A., Lopes, R.S., Ciarlini, P.C., Marques, F.J., Lima, V.M.F., Perri, S.H.V. & Feitosa, M.M. (2007). Evaluations of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate, *Research in Veterinary Science*, 83, 105-108. Acedido em Janeiro de 2008, através do site [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- João, A., Pereira, M.A., Cortes, S. & Santos-Gomes, G.M. (2006). Canine leishmaniasis chemotherapy: dog's clinical condition and risk of *Leishmania* transmission, *J. Vet. Med.*, 53, 540-545.
- Kontos, V.J. & Koutinas, A.F. (1993). Old world canine leishmaniasis, *Compendium*, 15, 949-959.
- Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Argyriadis, D., Fytianou, A. & Plevraki, K.G (1999). Clinical Considerations on Canine Visceral Leishmaniasis in Greece: A Retrospective Study of 158 Cases (1989–1996), *JOURNAL of the American Animal Hospital Association*, 35, 376-383
- Liste, F. & Gascon, M. (1995). Allopurinol in the treatment of canine visceral leishmaniasis, *The Veterinary Record*, 137, 23-24.
- López, X.R. (1997). Como trato: Leishmaniosis. In Proceedings of the Southern European Veterinary Conference/42nd annual national congress of AVEPA, Barcelona, Spain, 19-21 October.
- López, X.R. (2007). Diagnóstico de leishmaniosis. In Proceedings of the Southern European Veterinary Conference/42nd annual national congress of AVEPA, Barcelona, Spain, 19-21 October.
- Manna, I., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L.M. & Gravino, A.E. (2007). Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol, *The Veterinary Journal*, doi:10.1016/j.tvjl.2007.04.013
- Manzillo, V.F., Oliva, G., Pagana, A., Manna, L., Maroli, L. & Gradoni, L. (2006). Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs, *Veterinary Parasitology*, 142 (1-2), 142-145.
- Maroli, M., Mizzoni, V., Siragusa, C., D'Orazi, A. & Gradoni, L. (2001). Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy, *Medical and Veterinary Entomology*, 15, 358-363.
- Maynard, L., Woerly, V., Sanquer, A. & Médaille, C. (2006). Clinical efficacy of miltefosine oral solution in the treatment of canine leishmaniasis [abstract]. In Proceedings of the 31<sup>st</sup> annual world congress of the World Small Animal Veterinary Association, Prague, Czech Republic, 11-14 October.

- Miranda, S., Martorell, S., Costa, M., Ferrer, L. & Ramis A. (2006). Characterization of circulating lymphocyte subpopulation in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. Acedido em Novembro de 2007, a partir do site PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L. & Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs, *Research in Veterinary Science*, 85, 35–38. Acedido em Novembro de 2008, a partir do site PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G. & Baneth, G. (2008) Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two, *Trends in Parasitology*. Acedido em Novembro de 2008, a partir do site PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- Mohebbali, M., Fotoubi, A., Hooshmand, B., Zarei, Z., Akhoundi, B., Rahnema, A., Razaghian, A.R., Kabir, M.J. & Nadim, A. (2007). Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic leishmaniasis (ZCL) by randomized clinical trial in Iran. Acedido em Maio de 2008, a partir do site PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- Pennisi, M.G., De Majo, M., Masucci, M., Britti, D., Vitale, F. & Del Maso, R. (2005). Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin, *Veterinary Record*, 156, 346-349.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2002). *Microbiology*. (5<sup>th</sup> ed). New York: McGraw-Hill.
- Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L.S., Billinis, C., Koutinas, A.F., Galatos, A.D., Gouletsou, P., Diakou, A. & Kontos, V.I. (2005). Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in the endemic area, *Veterinary Parasitology*, 130 (3-4), 199-205
- Slappendel, R.J. (1988). Canine leishmaniasis; a review based on 95 cases in the Netherlands, *The Veterinary Quarterly*, 10, 1-16.
- Strauss-Ayali, D. & Baneth, G. (2000). Canine visceral leishmaniasis, *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Acedido em Março 2008, a partir do site IVIS. <http://www.ivis.org>
- Sundar, S. & Chatterjee, M. (2006). Visceral leishmaniasis – current therapeutic modalities, *Indian J. Med. Res*, 123, 345-352.
- Trotz-Williams, L. & Gradoni, L. (2003). Disease risks for the travelling pet: Leishmaniasis, *In Practice*, 190-197.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. & Jennings, F.W. (1996). *Protozoologia veterinária*. In *Parasitologia Veterinária*. (2<sup>a</sup> edição). (pp. 190-192). São Paulo: Guanabara Koogan.
- Valladares, J.E., Alberola, J., Esteban, M. & Arboix, M. (1996). Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs, *The Veterinary Record*, 138, 181-183.
- Valladares, J.E., Riera, C., González-Ensenyat, P., Díez-Cascón, A., Ramos, G., Solano-Gallego, L., Gallego, M., Portús, M., Arboix, M., Alberola, J. (2001). Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation [abstract]. *Veterinary Parasitology*, 97(1):15-21.

Vischer, C., Grousseau, D. & Médaille, C. (2007). Preliminary safety study of the combination therapy of miltefosine and allopurinol in dogs [abstract]. In Proceedings of the 32<sup>nd</sup> annual world congress of the World Small Animal Veterinary Association, Sydney, Australia, 19-23 August.