



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**A LEISHMANIOSE CANINA E OS CONDICIONALISMOS DETERMINADOS  
PELAS RESPECTIVAS ALTERAÇÕES RENAIS**

SOFIA DINIZ DE NAZARÉ BARBOSA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís  
Doutora Isabel Maria Soares Pereira  
da Fonseca de Sampaio  
Dr. André Miguel Mendes Tojo

ORIENTADOR

Dr. André Miguel Mendes Tojo

CO-ORIENTADOR

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**A LEISHMANIOSE CANINA E OS CONDICIONALISMOS DETERMINADOS  
PELAS RESPECTIVAS ALTERAÇÕES RENAIS**

SOFIA DINIZ DE NAZARÉ BARBOSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís  
Doutora Isabel Maria Soares Pereira  
da Fonseca de Sampaio  
Dr. André Miguel Mendes Tojo

ORIENTADOR

Dr. André Miguel Mendes Tojo

CO-ORIENTADOR

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

2011

LISBOA

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço ao meu orientador, Dr. André Tojo, pela oportunidade de estágio concedida, por todo o apoio manifestado durante o estágio e na realização desta dissertação e pela transmissão de conhecimentos durante a prática clínica.

Agradeço à Dra. Sara Santos, ao Dr. Francisco Gameiro, à Dona Ana Claudino e à Rita Fernandes, pelo ótimo ambiente de trabalho que me proporcionaram, pela partilha das suas experiências e por tudo o que me ensinaram.

Agradeço também à Dona Rosarinho e ao Sr. Miro, por me terem acolhido amavelmente na sua Clínica, pela preocupação que sempre demonstraram e pelo incentivo que me deram durante a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor Sales Luís, meu co-orientador, pela sua disponibilidade, pela paciência inesgotável para explicações e esclarecimentos e pelo acompanhamento prestado durante a elaboração da dissertação.

Um especial agradecimento à Professora Doutora Isabel Fonseca por toda a sua colaboração e pelo empenho manifestado na revisão deste trabalho.

Às minhas colegas Carina, Josefa, Marta, Madalena e Anna, por todas as experiências que partilhámos e pelos bons e maus momentos que vivemos ao longo do curso, que permitiram consolidar a nossa amizade.

À Helena, por ter estado sempre lá, para cada aula, cada trabalho, cada exame, cada obstáculo, ao longo destes anos. Por toda a paciência para as minhas inseguranças, frustrações e mudanças de humor, mas também pelas alegrias, experiências e conversas partilhadas. Acredito que no final deste percurso académico sou uma pessoa melhor e muito se deve a ela.

À Patrícia, à Margarida e à Rita, as minhas grandes amigas de sempre, com as quais cresci, que me acompanharam e apoiaram em todas as fases da vida, mesmo quando estava pouco presente ou “refugiada no mundo veterinário”.

Aos meus avós, tios e primos pelo entusiasmo que demonstraram quando entrei no curso que sempre quis e pela força que me deram ao longo de toda a minha vida. À Dona Flor por me ter acolhido durante cinco anos como se fosse um membro da sua família.

Aos meus pais e irmão por me terem dado as forças necessárias, pela paciência constante que tiveram, pelo amor e amizade incondicionais com que sempre me trataram e por terem sempre acreditado em mim, mesmo quando eu não acreditava. Obrigada por me terem dado a oportunidade de chegar onde cheguei e me terem ajudado a ser quem sou.

# A LEISHMANIOSE CANINA E OS CONDICIONALISMOS DETERMINADOS PELAS RESPECTIVAS ALTERAÇÕES RENAIIS

## Resumo

A Leishmaniose é uma doença zoonótica causada pelo protozoário da espécie *Leishmania infantum*, que existe predominantemente na Bacia do Mediterrâneo. O ciclo de vida deste parasita requer a existência de um vector, um insecto do género *Phlebotomus*, que é responsável pela transmissão das formas infectantes, os promastigotas metacíclicos, aos hospedeiros vertebrados, nomeadamente os canídeos. Em Portugal, apenas as espécies *P. ariasi* e *P. perniciosus* são vectores comprovados de *L. infantum*.

As características clínicas da Leishmaniose canina variam amplamente como consequência dos numerosos mecanismos patogénicos do protozoário, da diversidade de respostas imunológicas desenvolvidas nos hospedeiros e dos diferentes órgãos afectados. A doença renal pode ser a única manifestação clínica nos animais infectados, podendo progredir de proteinúria assintomática até síndrome nefrótico ou Insuficiência Renal Crónica, que é responsável pela degradação do estado geral e a principal causa de morte nos cães com Leishmaniose. A aplicação do tratamento adequado requer, previamente, um diagnóstico precoce da doença e a avaliação do estado sanitário e imunitário do animal, através do exame clínico e de exames complementares, que devem ser repetidos a cada 6 meses. A presença de Insuficiência Renal Crónica impõe algumas limitações no tratamento da Leishmaniose canina, sendo fundamental seleccionar cautelosamente os fármacos e respectivas doses a administrar a cada paciente.

Neste estudo retrospectivo foram observados 19 canídeos com Leishmaniose, sendo a sua sintomatologia muito variável, da qual se destaca a linfadenopatia, o emagrecimento e as lesões dermatológicas. As alterações laboratoriais mais frequentes foram a anemia não-regenerativa, a trombocitopénia, a hiperproteinémia com hiperglobulinémia e a proteinúria. O diagnóstico etiológico foi realizado com base nas técnicas de imunocromatografia rápida e de imunofluorescência indirecta. Foi também diagnosticada Insuficiência Renal Crónica em 4 canídeos da amostra. Diferentes fármacos foram utilizados no tratamento etiológico e sintomático, porém foi mais frequente a administração de alopurinol em monoterapia ou em associação com o antimoniato de glucamina.

**Palavras-chave:** Leishmaniose; *Leishmania infantum*; *Phlebotomus*; Insuficiência Renal Crónica; canídeo.

## CANINE LEISHMANIASIS AND CONSTRAINTS DETERMINED BY THEIR RENAL CHANGES

### Abstract

Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by the protozoan *Leishmania infantum*, which is the most common species of *Leishmania* in the Mediterranean basin. The life cycle of this parasite requires the existence of a vector, the insect of the genus *Phlebotomus*, which is responsible for the transmission of infectious form, the metacyclic promastigotes, to the vertebrate host, namely the dog. In Portugal, only the species *P. ariasi* and *P. perniciosus* are proven vectors of *L. infantum*.

The clinical features of canine Leishmaniasis are highly variable as a consequence of the numerous pathogenic mechanisms, the diversity of immune responses of individual hosts and the different organs affected. Renal disease may be the only clinical manifestation in infected dogs and may progress from asymptomatic proteinuria to nephrotic syndrome or to Chronic Kidney Disease, which is responsible for the deterioration of general condition and leading cause of death in dogs with Leishmaniasis. The application of suitable treatment requires, previously, an early diagnosis and assessment of dog's health and immunity status, by clinical examination and several routine diagnostic tests, which must be repeated every six months. The presence of Chronic Kidney Disease imposes some limitations in the treatment of canine Leishmaniasis and is necessary to select carefully the drugs and doses to be administered in each patient.

In this retrospective study, 19 dogs with Leishmaniasis were observed and many clinical signs were found, mainly lymphadenopathy, weight loss and dermatologic lesions. The most frequent laboratory abnormalities were non-regenerative anemia, thrombocytopenia, hyperproteinemia with hyperglobulinemia and proteinuria. The definitive diagnosis was made by a rapid immunomigration test and indirect fluorescent antibody technique. Chronic Kidney Disease was also diagnosed in 4 dogs of sample. Different drugs were used in the etiological and symptomatic treatment, but the administration of alopurinol alone or in combination with glucamine antimoniate were the most frequent.

**Keywords:** Leishmaniasis; *Leishmania infantum*; *Phlebotomus*; Chronic Kidney Disease; dog.

## ÍNDICE GERAL

---

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Abstract .....	iii
Índice Geral .....	iv
Índice de Figuras .....	vi
Índice de Tabelas .....	vii
Índice de Gráficos .....	viii
Índice de Abreviaturas e Símbolos .....	ix
I. Introdução .....	1
II. Revisão Bibliográfica .....	5
1. Etiologia .....	5
2. Epidemiologia .....	7
2.1. Vetores biológicos .....	7
2.2. Hospedeiros vertebrados .....	11
2.3. Ciclo biológico e Transmissão .....	13
2.4. Epidemiologia da Leishmaniose canina em Portugal .....	16
3. Patogenia e Susceptibilidade .....	20
4. Quadro Sintomatológico e Lesional .....	27
4.1. Lesões cutâneas .....	28
4.2. Lesões oculares .....	30
4.3. Lesões musculares, articulares e ósseas .....	31
4.4. Lesões do aparelho digestivo .....	32
4.5. Lesões dos órgãos linfóides .....	33
4.6. Lesões hepáticas .....	33
4.7. Lesões cardíacas e respiratórias .....	34
4.8. Lesões do aparelho reprodutor .....	34
4.9. Lesões do sistema nervoso .....	34
4.10. Consequências renais da Leishmaniose canina .....	35
5. Diagnóstico .....	39
5.1. Diagnóstico clínico .....	40
5.1.1. Anamnese e exame físico .....	40
5.1.2. Alterações hematológicas, bioquímicas e urinárias .....	40
5.1.3. Estadiamento e sub-estadiamento da Insuficiência Renal Crônica canina .....	46
5.2. Diagnóstico laboratorial .....	49
5.2.1. Diagnóstico parasitológico .....	49
5.2.2. Diagnóstico seroimunológico .....	51
5.2.3. Diagnóstico molecular .....	56
5.3. Estadiamento da Leishmaniose canina .....	57
6. Diagnóstico Diferencial e Doenças Concomitantes .....	58
7. Tratamento .....	59
7.1. Tratamento etiológico .....	61
7.1.1. Compostos antimoniais .....	61
7.1.2. Miltefosina .....	63
7.1.3. Análogos das purinas .....	63
7.1.4. Anfotericina B .....	64
7.1.5. Aminosidina .....	65
7.1.6. Diamidinas .....	65
7.1.7. Quinolonas .....	66
7.1.8. Derivados do imidazol .....	66
7.1.9. Outros fármacos .....	67
7.1.10. Associação de fármacos .....	67
7.2. Tratamento sintomático .....	68

7.2.1.	Medidas terapêuticas aplicadas na Insuficiência Renal Crónica canina .....	69
7.2.2.	Tratamento das lesões dermatológicas .....	76
7.2.3.	Tratamento das lesões oftalmológicas .....	76
8.	Prognóstico .....	76
9.	Controlo e Profilaxia .....	77
10.	Importância em Saúde Pública .....	80
III.	Estudo Retrospectivo dos cães com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC .....	81
1.	Objectivos .....	81
2.	Material e Métodos .....	81
2.1.	Limitações do estudo .....	82
3.	Resultados .....	82
3.1.	Caracterização da amostra .....	82
3.2.	Sinais clínicos .....	85
3.3.	Exames complementares .....	87
3.4.	Diagnóstico etiológico .....	90
3.5.	Diagnóstico de doenças concomitantes .....	91
3.6.	Tratamento etiológico e sintomático .....	92
4.	Discussão .....	94
5.	Conclusão.....	106
IV.	Bibliografia .....	108
V.	Anexos .....	116
1.	Algoritmo para o estadiamento da IRC nos cães, proposto pela IRIS em 2009 .....	116
2.	Algoritmo para o sub-estadiamento da IRC nos cães, de acordo com o valor de proteinúria, proposto pela IRIS em 2009.....	117
3.	Algoritmo para o sub-estadiamento da IRC nos cães, de acordo com o valor da pressão arterial sistémica, proposto pela IRIS em 2009 .....	118
4.	Algoritmo da abordagem diagnóstica nos cães com sintomatologia e/ou alterações clinicopatológicas compatíveis com Leishmaniose .....	119
5.	Caracterização da amostra de canídeos com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC .....	120
6.	Sintomatologia dos canídeos com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC .....	121
7.	Resultados dos hemogramas dos canídeos com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC .....	122
8.	Resultados das análises bioquímicas dos canídeos com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC .....	124
9.	Diagnóstico de Leishmaniose e das doenças concomitantes nos canídeos observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC .....	125
10.	Tratamento etiológico instituído nos canídeos com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC .....	126

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b> – Aspecto geral e “cauda de rato” no Hipotiroidismo Canino .....	2
<b>Figura 2</b> – Hérnia Inguinal num cão .....	2
<b>Figura 3</b> – Carcinoma Espinocelular num gato .....	2
<b>Figura 4</b> – Fractura de mandíbula numa cadela .....	3
<b>Figura 5</b> – Fecaloma num cão .....	3
<b>Figura 6</b> – Colapso traqueal num cão .....	3
<b>Figura 7</b> – Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. no interior e no exterior de um macrófago .....	5
<b>Figura 8</b> – Forma adulta (macho) de <i>Phlebotomus</i> spp. ....	8
<b>Figura 9</b> – Ovos de <i>Phlebotomus</i> spp. ....	8
<b>Figura 10</b> – Seborreia seca e alopecia peri-ocular, nos pavilhões auriculares e focinho .....	29
<b>Figura 11</b> – Dermatose ulcerativa no membro posterior .....	29
<b>Figura 12</b> – Nódulo cutâneo não ulcerado na região dorso-lombar .....	30
<b>Figura 13</b> – Hiperqueratose nasal .....	30
<b>Figura 14</b> – Querato-conjuntivite seca com secreção mucopurulenta .....	31
<b>Figura 15</b> – Caquexia .....	32
<b>Figura 16</b> – Atrofia dos músculos da cabeça .....	32
<b>Figura 17</b> – Ascite num cão com Leishmaniose e síndrome nefrótico .....	39
<b>Figura 18</b> – Diagnóstico parasitológico directo por citologia .....	50

## ÍNDICE DE TABELAS

---

<b>Tabela 1</b> – Frequência relativa das consultas assistidas durante o estágio curricular .....	1
<b>Tabela 2</b> – Distribuição geográfica e formas clínicas da doença causada por <i>Leishmania</i> spp. ....	7
<b>Tabela 3</b> – Distribuição mundial dos vectores biológicos da Leishmaniose canina .....	10
<b>Tabela 4</b> – Estadiamento da Insuficiência Renal Crónica canina .....	46
<b>Tabela 5</b> – Sub-estadiamento da Insuficiência Renal Crónica canina com base no rácio UPC .....	47
<b>Tabela 6</b> – Sub-estadiamento da Insuficiência Renal Crónica canina com base na pressão arterial sistémica .....	48
<b>Tabela 7</b> – Estadiamento clínico da Leishmaniose canina .....	58
<b>Tabela 8</b> – Recomendações terapêuticas para a IRC canina .....	75
<b>Tabela 9</b> – Frequência absoluta e relativa das raças dos canídeos da amostra .....	84
<b>Tabela 10</b> – Resultados do hemograma de 16 animais e o seu respectivo estudo estatístico .....	87
<b>Tabela 11</b> – Alterações dos parâmetros bioquímicos dos canídeos com Leishmaniose.....	88
<b>Tabela 12</b> – Resultados do rácio proteína/creatinina urinário de 4 canídeos com Leishmaniose .....	89
<b>Tabela 13</b> – Doenças concomitantes presentes nos 6 canídeos com Leishmaniose .....	91

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

---

<b>Gráfico 1</b> – Frequência absoluta dos tipos de cirurgia assistidos durante o estágio curricular .....	3
<b>Gráfico 2</b> – Frequência relativa do sexo dos canídeos da amostra .....	83
<b>Gráfico 3</b> – Histograma de distribuição dos canídeos da amostra por classes etárias .....	83
<b>Gráfico 4</b> – Frequência relativa do tipo de habitat dos canídeos da amostra .....	85
<b>Gráfico 5</b> – Frequência relativa do tipo de prevenção contra a picada do insecto vector realizada nos canídeos da amostra .....	85
<b>Gráfico 6</b> – Frequência absoluta e relativa dos sinais clínicos dos canídeos da amostra .....	86
<b>Gráfico 7</b> – Frequência relativa do método de diagnóstico utilizado nos canídeos da amostra .....	91
<b>Gráfico 8</b> – Distribuição dos canídeos da amostra segundo o ano de diagnóstico .....	91

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

- > – Maior  
≥ – Maior ou igual  
< – Menor  
≤ – Menor ou igual  
°C – Graus Célsius  
® – Marca registada  
μL – Microlitro  
μm – Micrómetro  
% – Percentagem  
ADH – Hormona antidiurética ou vasopressina  
ADN – Ácido desoxirribonucleico  
ALT – Alanina aminotransferase  
ANA – Anticorpos anti-nucleares  
APC – Células apresentadoras de antigénios  
aPTT – Tempo de tromboplastina parcial activada  
AST – Aspartato aminotransferase  
CAMV – Centro de Atendimento Médico-Veterinário  
CD4<sup>+</sup> – Linfócitos T *helper*  
CD8<sup>+</sup> – Linfócitos T citotóxicos  
CD21<sup>+</sup> – Linfócitos B  
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média  
CIC – Complexos imunes circulantes  
CIE – Contraimunolectroforese  
CLWG – Canine Leishmaniasis Working Group  
cm – Centímetro  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
cp – Comprimido  
CR – Receptor do complemento  
DAPP – Dermatite Alérgica à Picada de Pulga  
DAT – Teste de aglutinação directa  
DD – Diagnóstico diferencial  
dL – Decilitro  
DLA – Sistema do antigénio leucocitário canino  
ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
FAS – Fosfatase alcalina sérica  
FCS – Soro fetal bovino  
FDP – Produtos de degradação do fibrinogénio

FeLV – Vírus da Leucemia Felina  
FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina  
fL – Fentolitro  
FML – Ligando fucose-manose  
g – grama  
Gp – Glicoproteína  
HCM – Hemoglobina corpuscular média  
HE – Hematoxilina-Eosina  
HI – Hemaglutinação indirecta  
IECA – Inibidor da enzima de conversão da angiotensina  
IFI – Imunofluorescência indirecta  
IFN- $\gamma$  – Interferão gamma  
Ig – Imunoglobulina  
IL – Interleucina  
iNOs – Sintetase induzida do óxido nítrico  
IRC – Insuficiência Renal Crónica  
IRIS – *International Renal Interest Society* ou Sociedade Internacional de Interesse Renal  
IV – Via endovenosa  
Kg – Quilograma  
km – Quilómetro  
L – Litro  
LC – Leishmaniose Cutânea  
LCM – Leishmaniose Mucocutânea  
LPG - Lipofosfoglicano  
LV – Leishmaniose Visceral ou “ Kala-azar”  
MAD – Membro anterior direito  
mEq – Miliequivalente  
mg – Miligrama  
MHC-II – Moléculas da classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade  
mL – Mililitro  
mm – Milímetro  
mmHg – Milímetro de mercúrio  
mmol – Milimole  
MP – Membros posteriores  
MPD – Membro posterior direito  
MPE – Membro posterior esquerdo  
NNN – Meio Novy, Nicolle e McNeal  
NO – Óxido nítrico  
NP – Não proteinúrico  
OD – Olho direito

OE – Olho esquerdo  
OIE – *Office International des Epizooties*  
ONLeish – Observatório Nacional das Leishmanioses  
P – Proteinúrico  
PA – Pressão arterial  
PCR – *Polymerase Chain Reaction* ou Reacção em Cadeia da Polimerase  
PD – Polidipsia  
pg – Picograma  
PL – Proteinúrico no limite  
PMNs – Polimorfonucleares neutrófilos  
PO – via *per os*  
PT – Proteínas totais  
PTH – Paratormona  
PU – Poliúria  
r-HuEPO – Eritropoietina recombinante humana  
RNA – Ácido ribonucleico  
RT-PCR – *Real Time-PCR* ou PCR em tempo real  
SC – Via subcutânea  
SID – A cada 24 horas  
SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida  
SMF – Sistema macrofágico fagocítico  
SSA – Teste turbidimétrico do ácido sulfosalicílico  
TCR – Receptores dos linfócitos T  
TGF- $\beta$  – Factor de crescimento beta  
Th – Linfócito T *helper*  
Th1 – Linfócitos T *helper* do tipo 1  
Th2 – Linfócitos T *helper* do tipo 2  
TNF- $\alpha$  – Factor de necrose tumoral alfa  
TT – Tempo de trombina  
UI – Unidades internacionais  
UPC – Rácio proteína/creatinina urinário  
VCM – Volume corpuscular médio  
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana  
WB – *Western Blot*

Esta dissertação de Mestrado não foi escrita segundo o novo Acordo Ortográfico.

## I. INTRODUÇÃO

---

No término do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, a autora realizou o estágio curricular na Clínica Veterinária da Associação de Protecção aos Animais Abandonados do Cartaxo (VET APAAC), sob orientação do Dr. André Tojo e com o acompanhamento da Dra. Sara Santos e do Dr. Francisco Gameiro. O estágio decorreu oficialmente entre 6 de Setembro de 2010 e 8 de Janeiro de 2011, sendo posteriormente prolongado até 5 de Fevereiro de 2011, o que correspondeu a uma carga horária total de 790 horas.

Durante o estágio a autora teve a oportunidade de assistir e participar nos serviços de Medicina Interna, Imagiologia, Cirurgia e Internamento, prestados aos animais de companhia. A espécie que surgiu para consulta com maior frequência relativa foi a espécie canina (75,1%), seguida da felina (24,5%) e dos animais exóticos (0,4%), dos quais se destacam sobretudo os leporídeos (0,3%) e os roedores (0,1%).

No serviço de Medicina Interna, acompanhou e auxiliou o Médico Veterinário durante a realização da anamnese, exame físico e exames complementares, participou na discussão dos possíveis diagnósticos e das terapêuticas a instituir, colaborando ainda na sua administração. A autora pode contactar com diferentes áreas da Medicina Interna, destacando-se, entre outras, as consultas de medicina preventiva, reavaliação, dermatologia e gastroenterologia. Na Tabela 1 estão representadas as frequências relativas das consultas assistidas, tendo em conta que o mesmo animal pode ser observado em mais do que uma especialidade.

**Tabela 1** – Frequência relativa das consultas assistidas durante o estágio curricular

Medicina Preventiva	46,9%	Oftalmologia	1,5%
Reavaliação	20,9%	Nefrologia/Urologia	1,2%
Dermatologia	7,2%	Cardiologia	0,7%
Gastroenterologia	6,8%	Neurologia	0,6%
Ortopedia	4%	Endocrinologia	0,4%
Pneumologia	3%	Toxicologia	0,4%
Doenças Infecciosas/ Parasitárias	2,4%	Odontologia	0,1%
Reprodução e Obstetrícia	2,4%	Outros	1,5%

As consultas de medicina preventiva incluíram a emissão de passaportes, as recomendações aplicadas ao manejo e educação dos animais, a vacinação e desparasitação interna e/ou externa, reforçando a sua importância na prevenção de doenças infecciosas e parasitárias, a

colocação de *microchip*, como modo de identificação electrónica do animal, e o corte de unhas.

Nas consultas de reavaliação foi efectuado o acompanhamento pós-cirúrgico dos animais, incluindo a desinfeção de suturas, mudança de penso e remoção de pontos ou agrafos, tendo também sido realizadas transfusões, análises sanguíneas de seguimento e eutanásias.

Por outro lado, a autora considerou na área “Outros”, todas as consultas de emergência observadas, sendo a maioria devido a traumatismo de natureza variada, como arma de fogo, atropelamento ou queda, mas também incluiu casos mais atípicos, como a hipotermia resultante de queda e permanência de um cão num poço.

Da totalidade de consultas presenciadas podem-se destacar alguns exemplos, pelo seu particular interesse, como Doença Vestibular numa gata, Hipotiroidismo em cadela (Figura 1), Hérnia Inguinal num cão (Figura 2), Carcinoma Espinocelular em gato (Figura 3), Doença Inflamatória Crónica Intestinal num cão, entre muitos outros.

**Figura 1** – Aspecto geral e “cauda de rato” no Hipotiroidismo Canino (fotografia original)



**Figura 2** – Hérnia Inguinal num cão (fotografia original)



**Figura 3** – Carcinoma Espinocelular em gato (fotografia original)



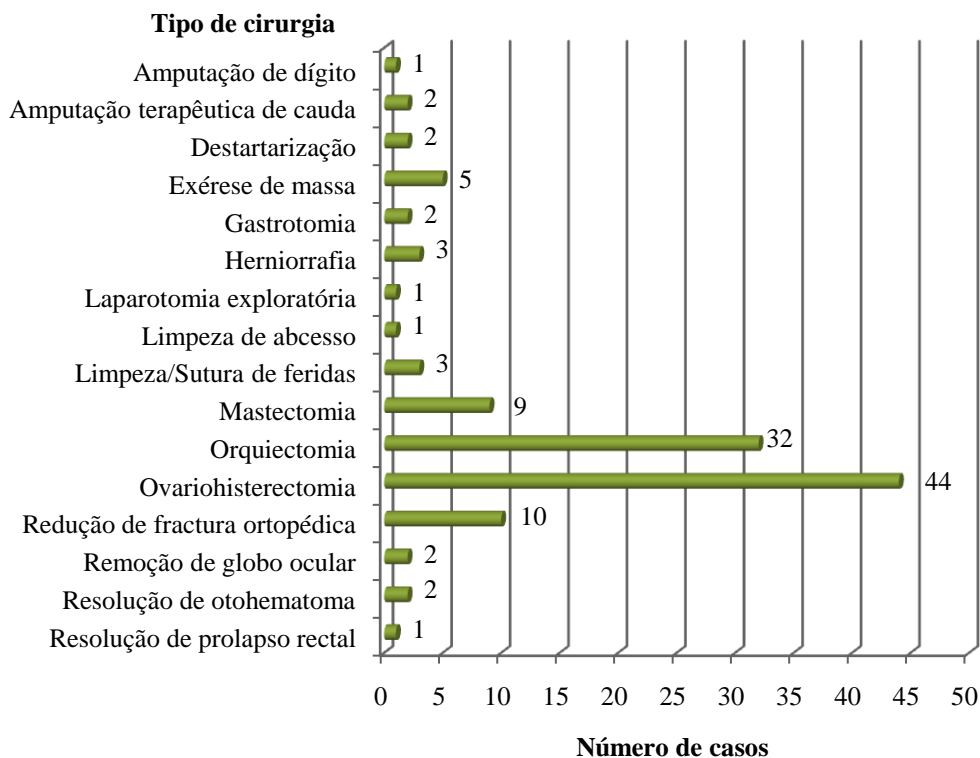
No serviço de Imagiologia, teve oportunidade de conhecer o funcionamento do aparelho de raio-X, efectuar o posicionamento do animal, proceder à revelação das películas radiográficas, participando, posteriormente, na sua interpretação. Durante o estágio curricular pode ainda assistir, interpretar e debater, com o Médico Veterinário, algumas ecografias abdominais realizadas. Entre os inúmeros exames radiográficos elaborados, é possível salientar a fractura de mandíbula numa cadela (Figura 4), fecaloma associado à ingestão de ossos num cão (Figura 5) e colapso traqueal num cão (Figura 6).

**Figura 4** – Fractura de mandíbula numa cadela (fotografia original) **Figura 5** – Fecaloma num cão (fotografia original) **Figura 6** – Colapso traqueal num cão (fotografia original)



Na Cirurgia, participou na preparação pré-operatória do animal, desempenhou a função de ajudante de cirurgião, monitorizou a anestesia e o pós-operatório e, sob orientação do Médico Veterinário, realizou suturas de pele e orquiectomias em gatos. No Gráfico 1 encontram-se discriminados os tipos de cirurgia realizados, destacando-se, pelo seu número, as ovariectomias e as orquiectomias. Para a autora, a elevada frequência destes dois procedimentos cirúrgicos revela, por um lado, a motivação dos proprietários em reduzir o comportamento sexual dos seus animais, mas por outro lado, comprova a crescente consciencialização dos donos para os benefícios na saúde que destas cirurgias podem advir, quando realizadas em animais jovens.

**Gráfico 1** – Frequência absoluta dos tipos de cirurgia assistidos durante o estágio curricular



No serviço de Internamento, participou na monitorização, alimentação e passeios no exterior dos animais, cooperou na realização de enemas, algaliação e lavagem vesical, auxiliou na cateterização dos pacientes para recolha de sangue e/ou para administração de fluidoterapia, preparou e administrou as medicações prescritas pelo Médico Veterinário, fossem por via oral, subcutânea, intramuscular ou endovenosa. Procedeu ainda a limpeza de feridas e mudança de pensos e contribuiu para a manutenção da higiene dos animais e das instalações, uma vez que esta é fundamental para o bem-estar animal e dos profissionais que nelas trabalham.

Ao longo de todo o estágio, a autora colaborou no atendimento ao público, pode realizar consultas de aconselhamento após adopção de animais, preencher os formulários do *microchip*, fazer a colheita e análise de urina, colocar cateteres endovenosos, recolher sangue para análise bioquímica e hematológica, realizar testes rápidos de diagnóstico de *Leishmania*, *Dirofilaria*, *Ehrlichia*, *Parvovirus*, Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e Vírus da Leucemia Felina (FeLV), entre outros. Através de um microscópio óptico, pode observar citologias cutâneas e auriculares, bem como esfregaços de sangue periférico para detecção de microfilárias. Para além destas actividades, participou na preparação do material cirúrgico e na reposição de produtos e medicamentos, tendo ainda assistido à apresentação de novos fármacos e equipamentos existentes no mercado nacional. A autora considera o estágio curricular como uma etapa fundamental no longo percurso académico, uma vez que permitiu colocar em prática algumas das aprendizagens obtidas no curso e contribuiu igualmente para adquirir novos conhecimentos e competências, enquadrados na clínica médica e cirúrgica, e para interiorizar os comportamentos adequados ao exercício da profissão.

O tema escolhido para a dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi “ A Leishmaniose canina e os condicionalismos determinados pelas respectivas alterações renais”, uma vez que esta é uma doença de interesse para a autora, tendo uma prevalência significativa na região onde o estágio foi efectuado, e porque constitui uma das doenças parasitárias mais importantes em Medicina Veterinária, mas também em Saúde Pública, pelo seu carácter zoonótico. Esta doença apresenta um desenvolvimento crónico, podendo ter quadros clínicos e lesionais muito diversificados, dos quais se destacam, pela sua frequência, as lesões renais, cuja progressão conduz a Insuficiência Renal Crónica (IRC). A dissertação encontra-se dividida em duas partes: a primeira é constituída pela revisão bibliográfica sobre a Leishmaniose e a IRC, onde se reuniu a informação obtida da consulta de livros e artigos científicos, enquanto a segunda parte representa o estudo retrospectivo dos casos clínicos de Leishmaniose canina acompanhados ao longo do estágio curricular.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

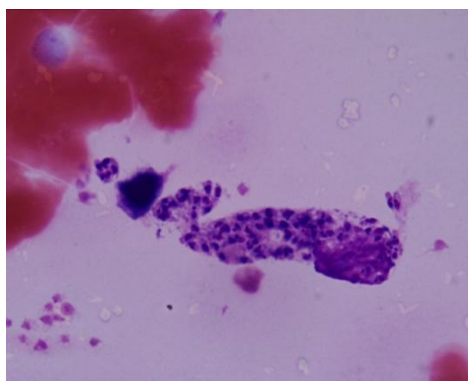
---

### 1. ETIOLOGIA

A Leishmaniose é uma doença zoonótica causada por um protozoário pertencente ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Sub-filo Mastigophora, Ordem Kinetoplastida, Sub-ordem Trypanosomatina, Família Trypanosomatidae e Género *Leishmania* (Campillo *et al.*, 1999).

O parasita *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas e necessita de dois hospedeiros diferentes (um insecto vector e um vertebrado) para completar o seu ciclo de vida. A forma promastigota, presente no insecto, é extracelular, fusiforme, tem 5-20  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1-4  $\mu\text{m}$  de largura e apresenta um flagelo que lhe confere mobilidade (Roze, 2005). O género *Leishmania* divide-se em sub-género *Viannia* e *Leishmania*, com base nas diferenças existentes durante o desenvolvimento dos promastigotas no insecto vector (Baneth, 2006). Por outro lado, no hospedeiro vertebrado é observada a forma amastigota (Figura 7), de formato ovóide ou redondo, com 2,5-5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5-2  $\mu\text{m}$  de largura, desprovida de motilidade, apresentando apenas um flagelo rudimentar, que não é visível por microscopia óptica convencional. As formas amastigotas estão, geralmente, localizadas nas células do Sistema Macrofágico Fagocítico (SMF), nomeadamente nos macrófagos, monócitos, células de Langerhans, células de Kupffer e células apresentadoras de antígenos (Roze, 2005; Baneth, 2006).

**Figura 7** – Formas amastigotas de *Leishmania* spp. no interior e no exterior de um macrófago (fotografia original)



A estrutura básica de *Leishmania* é a de uma célula eucariótica normal, apresentando os organelos vulgarmente encontrados neste tipo de células. De salientar, que muitos dos seus organelos são em número singular e se localizam em regiões específicas, como por exemplo o

cinetoplasto, que é observado perto da origem do flagelo, em ambas as formas do protozoário, correspondendo ao ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (Tomás & Romão, 2008).

A classificação do género *Leishmania* tem sido complexa e, por vezes, até controversa. Os critérios morfológicos inicialmente utilizados para diferenciar as espécies, demonstraram ser insuficientes, contribuindo para o desenvolvimento e utilização de novas técnicas, que têm permitido alterar a taxonomia estabelecida e revelar que, por vezes, diferentes espécies eram atribuídas ao mesmo agente (Roze, 2005).

Actualmente, a diferenciação é realizada utilizando métodos bioquímicos e genéticos, como a análise estrutural da membrana celular e dos ácidos gordos, a reactividade imunológica a anticorpos monoclonais, a sequenciação do ADN e a avaliação de isoenzimas. Deste modo, uma das classificações consideradas recorreu à análise do ADN do cinetoplasto, com recurso a enzimas de restrição, permitindo distinguir os parasitas com ADN mitocondrial similar. No entanto, o modelo taxonómico actualmente aceite tem como base uma avaliação electroforética das isoenzimas do protozoário, que permite a identificação de zimodemes, isto é, dos grupos de parasitas com um padrão enzimático idêntico (Noli, Lloyd, Loeffler, Schwendenwein & Meredith, 2006).

Existem cerca de 30 espécies diferentes de *Leishmania*, distribuídas pelos países do Novo Mundo, que engloba o continente americano, e do Velho Mundo, constituído, por sua vez, pelos continentes europeu, asiático e africano. No entanto, somente 20 espécies são responsáveis pela infecção em seres humanos, sendo a maioria zoonótica, enquanto uma pequena percentagem é estritamente antroponótica, ou seja, transmitida directamente entre pessoas, por exemplo via insecto. A doença nos humanos pode ser classificada, de acordo com as manifestações clínicas presentes, como Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) ou Leishmaniose Visceral (LV), também designada por “Kala-azar”. É de salientar que algumas espécies originam mais do que uma forma da doença, podendo haver, deste modo, múltiplas espécies responsáveis por cada tipo clínico de Leishmaniose (Baneth, 2006). Na Tabela 2 está sintetizada a distribuição geográfica dos agentes etiológicos da Leishmaniose canina e humana.

**Tabela 2** – Distribuição geográfica e formas clínicas da doença causada por *Leishmania* spp.

(Adaptado de Tomás & Romão, 2008 e de Solano-Gallego *et al.*, 2009)

	Espécie de <i>Leishmania</i>	Leishmaniose canina	Leishmaniose humana
Velho Mundo	<i>L. infantum</i>	Sim	LC, LV
	<i>L. tropica</i>	Sim	LC
	<i>L. aethiopica</i>	Não	LC
	<i>L. archibaldi</i>	Não	LV
	<i>L. donovani</i>	Sim	LC, LV
	<i>L. major</i>	Não	LC
Novo Mundo	<i>L. chagasi</i>	Sim	LC, LV
	<i>L. amazonensis</i>	Não	LC
	<i>L. braziliensis</i>	Sim	LC, LMC
	<i>L. guyanensis</i>	Não	LC
	<i>L. mexicana</i>	Não	LC
	<i>L. panamensis</i>	Sim	LC, LMC
	<i>L. peruviana</i>	Sim	LC

Legenda: LC, Leishmaniose Cutânea; LMC, Leishmaniose Mucocutânea; LV, Leishmaniose Visceral

Estudos genéticos permitiram concluir que, ao contrário do que era considerado, as espécies *L. infantum* e *L. chagasi* correspondem ao mesmo protozoário, permanecendo ambas as designações como sinónimos, no Velho e Novo Mundo (Baneth, 2006).

O protozoário *L. infantum* foi subdividido em zimodemes “MON”, pelo laboratório de referência em Montpellier, para a Organização Mundial de Saúde. Na Bacia do Mediterrâneo, o zimodeme Montpellier-1 (MON-1) é o mais frequentemente implicado na infecção canina e humana (Hide, Bañuls, & Tibayrenc, 2001).

## 2. EPIDEMIOLOGIA

### 2.1. Vectores biológicos

Os vectores naturais de *Leishmania* spp. são insectos da Ordem Diptera, Família Psychodidae e Sub-família Phlebotominae, vulgarmente denominados de flebótomos, sendo também vectores biológicos de *Bartonella* e de vários arbovírus (Rosypal *et al.*, 2003). Entre os 13 géneros de flebótomos actualmente aceites, dois estão envolvidos na transmissão das formas promastigotas do protozoário: o género *Phlebotomus* no Velho Mundo e o género *Lutzomyia*

no Novo Mundo. Por outro lado, apesar de serem conhecidas cerca de 700 espécies flebotomínicas, apenas 50 são vectoras de *Leishmania* spp., podendo ser encontradas em regiões geográficas e nichos ecológicos muito diferentes, como por exemplo, em florestas tropicais húmidas, em locais de clima temperado ou em desertos, abaixo do nível do mar ou mesmo em aldeias localizadas nas montanhas. Contudo, é importante referir que a distribuição dos flebótomos pode não ser contínua, uma vez que está condicionada pelo tipo de clima, vegetação e composição dos solos, factores fundamentais para o seu ciclo de vida (Baneth, 2006; Afonso & Alves-Pires, 2008).

Os flebótomos são insectos holometabólicos, ou seja, apresentam metamorfoses completas, sendo o seu ciclo biológico dividido entre o meio aéreo, onde estão presentes os adultos (Figura 8), e o meio terrestre, onde se desenvolvem, de forma livre, os ovos (Figura 9), os quatro estadios larvares e as pupas (Rosypal *et al.*, 2003; Afonso & Alves-Pires, 2008).

**Figura 8** – Forma adulta (macho) de *Phlebotomus* spp. (fotografia original)



**Figura 9** – Ovos de *Phlebotomus* spp. (fotografia original)



Os insectos **adultos** são pequenos (2 a 3 mm), de cor castanha ou cinzenta, densamente revestidos por sedas. Apresentam um aparelho bucal do tipo picador-sugador, três pares de longas patas, um par de asas, que em repouso formam um V, e manifestam um acentuado dimorfismo sexual, uma vez que no macho o abdómen termina em forma de garra, o que lhe permite segurar a fêmea durante a cópula (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Ambos os sexos são fitófagos, ou seja, obtém a energia imprescindível para a sua sobrevivência através da ingestão de sucos e açúcares de plantas ou de outros insectos, como os pulgões. No entanto, as fêmeas são também hematófagas e telmofágicas, uma vez que ingerem sangue do hospedeiro vertebrado através da formação de um pequeno hematoma no local da picada, sendo que esta ingestão lhes permite obter os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos seus ovos. Deste modo, é possível compreender que apenas as fêmeas são responsáveis pela transmissão de *Leishmania* spp. (Rosypal *et al.*, 2003; Afonso & Alves-Pires, 2008).

A actividade dos flebótomos é crepuscular ou nocturna e a sua deslocação é feita através de voos curtos e irregulares, que geralmente não ultrapassam 1 ou 2 km de distância do local de reprodução, excepto se favorecidos pelo vento. Nos países de clima temperado, como na Bacia do Mediterrâneo e na Ásia, estes insectos vectores são sobretudo activos nos meses mais quentes, compreendidos entre a Primavera e o final do Outono, enquanto em países de clima tropical, como na América Latina, algumas espécies estão activas durante todo o ano (Baneth, 2006). Em Portugal, a época de transmissão do protozoário pelo vector inicia-se em Março-Abril e termina em Setembro-Outubro. Como locais de repouso e abrigo diurnos destacam-se as habitações humanas e refúgios animais (comportamento endofílico), mas também os arbustos, matas e muros de pedra (comportamento exofílico) (Afonso & Alves-Pires, 2008; Tsachev, Papadogiannakis, Harizanov & Zarkov, 2008). Por outro lado, os flebótomos podem entrar nas habitações durante a noite, uma vez que têm fototropismo positivo (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Os **ovos** das espécies flebotomínicas são oblongos, escuros e ornamentados, com cerca de 0,4 mm, sendo colocados em solos húmidos, protegidos da luz solar directa (Afonso & Alves-Pires, 2008; Tsachev *et al.*, 2008).

As **larvas** têm aspecto vermiforme, com a cabeça bem desenvolvida e quitinizada e com segmentação do tórax e abdómen, atingindo cerca de 8 mm de comprimento, no último estadio de desenvolvimento. As quatro fases larvares desenvolvem-se em solos húmidos, abrigados, com temperaturas estáveis e ricos em matéria orgânica em decomposição, de origem animal ou vegetal, que representa a sua fonte alimentar, permitindo classificá-las como saprófagas e fitófagas. As fendas em paredes e muros, entulho, fendas profundas no terreno, jardins, tocas, estábulos, estrumeiras, valetas e depósitos são alguns exemplos de biótopos onde estas formas evolutivas podem estar presentes. Nas regiões temperadas, durante o Inverno, o último estadio larvar entra em diapausa, retomando o ciclo no Verão (Afonso & Alves-Pires, 2008; Sharma & Singh, 2008).

As **pupas** possuem um formato ligeiramente globoso, têm cefalotórax e cerca de 3 mm de comprimento, não se alimentando e permanecendo imóveis (Afonso & Alves-Pires, 2008).

A duração do ciclo de vida dos flebótomos é variável, em função da temperatura, humidade relativa, pluviosidade e fotoperíodo, uma vez que estes factores influenciam o desenvolvimento das formas imaturas, a eclosão e a actividade normal dos adultos. Assim sendo, de acordo com o clima, a região (latitude, altitude, longitude) e a espécie flebotomínica, poderá até ocorrer mais do que uma época de eclosão (Afonso & Alves-Pires, 2008). De um modo geral, pode-se considerar que o desenvolvimento das formas imaturas

demora 28 a 82 dias, e que as formas adultas vivem entre 14 e 45 dias, o que permite que as fêmeas se alimentem mais do que uma vez, perpetuando a inoculação de *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado (Tsachev *et al.*, 2008). No futuro, poderá existir um maior risco de transmissão do protozoário pelos insectos vectores, uma vez que o aumento da temperatura ambiental pode diminuir o período de desenvolvimento do parasita no flebótomo e aumentar o período de actividade dos insectos adultos, o número anual de gerações e a densidade do vector (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Os flebótomos apresentam susceptibilidade e competência vectorial para uma ou mais espécies de *Leishmania*, dependendo da capacidade de ligação específica das formas promastigotas aos receptores do aparelho digestivo do insecto (Baneth, 2006; Afonso & Alves-Pires, 2008). Os estudos epidemiológicos da Leishmaniose iniciam-se, frequentemente, com a caracterização morfológica e genética do vector, seguida da sua identificação taxonómica. Estes processos, apesar de complexos, permitem conhecer as espécies flebotomínicas prevalentes e estabelecer relação entre estas e as espécies do protozoário transmitidas (Sharma & Singh, 2008). Na tabela 3, está sintetizada a diversidade de espécies dos géneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, bem como a sua distribuição mundial.

**Tabela 3** – Distribuição mundial dos vectores biológicos de Leishmaniose Canina (Adaptado de Rosypal *et al.*, 2003)

Género <i>Phlebotomus</i>	Distribuição Mundial	Género <i>Lutzomyia</i>	Distribuição Mundial
<i>P. ariasi</i>	Mediterrâneo Ocidental		
<i>P. chinensis</i>	Norte e Centro da China		
<i>P. kandelakki</i>	Líbano, Turquia, Irão, Afeganistão		
<i>P. langeroni</i>	Espanha, Norte de África		
<i>P. longicuspis</i>	Espanha, Norte de África		
<i>P. longiductus</i>	Ásia Central, Norte de África	<i>Lu. evansi</i>	Colômbia, Venezuela, Costa Rica
<i>P. neglectus</i>	Mediterrâneo Oriental	<i>Lu. longipalpis</i>	América Central e do Sul
<i>P. perfiliewi</i>	Bacia do Mediterrâneo	<i>Lu. shannoni</i>	América do Sul, Sudeste dos E.U.A
<i>P. perniciosus</i>	Bacia do Mediterrâneo	<i>Lu. youngi</i>	América Central e do Sul
<i>P. smirnovi</i>	Ásia Central		
<i>P. syriacus</i>	Israel, Jordânia, Síria		
<i>P. tobbi</i>	Mediterrâneo Oriental, Sicília		
<i>P. transcaucasicus</i>	Azerbaijão		
<i>P. sergenti</i>	Médio Oriente, Norte de África		

Legenda: Todos estes vectores transmitem *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*), com excepção de *P. sergenti*, vector de *L. tropica*; E.U.A., Estados Unidos da América.

Actualmente, são conhecidas em Portugal cinco espécies de flebótomos, sendo quatro do género *Phlebotomus* (*P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. papatasi* e *P. sergenti*) e uma do género *Sergentomya* (*Sergentomya minuta*). Esta última espécie é conhecida como vector de *Leishmania* do sub-género *Sauroleishmania*, presente em alguns lacertídeos (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Estudos realizados em Portugal demonstraram que *P. sergenti* é mais frequente no sul, nomeadamente na região de Évora, que *P. papatasi* é pouco frequente no país e que *Sergentomya minuta* é mais abundante no Algarve, existindo em menor número na região do Alto Douro. É de salientar, no entanto, que apenas as espécies *P. ariasi* e *P. perniciosus* são vectores comprovados de *L. infantum* no nosso país, sendo ambas as espécies prevalentes na região de Lisboa. Contudo, o flebótomo *P. ariasi* mostrou ser predominante no Alto Douro e menos frequente no sul do país, contrariamente à espécie *P. perniciosus*, encontrada em menor número na região do Alto Douro, mas com frequência elevada na região algarvia. Em condições climáticas normais, a espécie *P. ariasi* é do tipo difásico, apresentando dois picos de actividade, nomeadamente em Junho e Setembro, enquanto que *P. perniciosus* exibe um ciclo monofásico, com o seu pico em Julho. Por outro lado, *P. perniciosus* manifesta um carácter endofílico, encontrando-se sobretudo em biótopos domésticos e a espécie *P. ariasi* apresenta um comportamento exofílico, dominando os biótopos silváticos. As preferências alimentares destes insectos variam dentro da mesma espécie, de acordo com a região onde se encontram, havendo umas populações mais zooantropofílicas e outras mais zoofílicas (Afonso & Alves-Pires, 2008).

## **2.2. Hospedeiros vertebrados**

Existe uma grande diversidade de hospedeiros vertebrados de *Leishmania* spp., sendo classificados como hospedeiros reservatórios, aqueles que constituam uma fonte de infecção para o Homem e permitam a multiplicação ilimitada do protozoário. Por outro lado, as espécies que podem ser infectadas por *Leishmania* e representar, ocasionalmente, fonte de infecção para os humanos, mas que não contribuem para a sobrevivência, a longo prazo, dos parasitas, são consideradas hospedeiros acidentais, podendo contudo introduzir ou reintroduzir o agente em certas áreas (Pereira, 2008).

O cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório doméstico e peridoméstico de *L. infantum*, em países do Sul da Europa, Médio Oriente, Ásia e Norte de África, e de *L. chagasi*, em países da América Central e do Sul. Porém, várias espécies de canídeos selvagens têm sido consideradas reservatórios silváticos do protozoário *L. infantum/L. chagasi*, nomeadamente o

lobo (*Canis lupus*), o chacal (*Canis aureus*) e a raposa (*Vulpes spp.*, *Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus*) (Pereira, 2008). Por outro lado, no Sub-contidente Indiano e na África Oriental, é o Homem o principal hospedeiro reservatório de *L. donovani*, sem haver intervenção de outros animais na transmissão antroponótica do agente (Baneth, 2006).

Geralmente, para que haja transmissão da doença aos seres humanos é necessária a intercepção entre o nicho ecológico do flebótomo, o de um reservatório silvático ou doméstico e o do Homem. Deste modo, atribui-se a manutenção do ciclo doméstico aos cães domiciliados e do ciclo peridoméstico aos cães errantes e canídeos selvagens, que parecem apresentar um sinantropismo progressivo, isto é uma crescente associação ao Homem e suas residências. No entanto, como ainda não está completamente esclarecido o papel dos canídeos selvagens na epidemiologia desta doença, é fundamental avaliar, isoladamente, cada ecossistema onde a Leishmaniose está presente (Baneth, 2006; Pereira, 2008).

Os hospedeiros acidentais de *Leishmania spp* incluem o urso, o porco-espinho, o guaxinim, o esquilo, o rato-negro, a vaca, a ovelha, a cabra, o cavalo e o gato (Roze, 2005; Pereira, 2008).

A Leishmaniose equina tem sido descrita na Europa, causada por *L. infantum*, e manifesta-se através de lesões dermatológicas, onde ocorre acumulação do protozoário (Pereira, 2008). Em Portugal, o primeiro caso foi reportado em 2005, num equino de 17 anos que habitava na região Metropolitana de Lisboa (Rolão, Martins, João & Campino, 2005). Normalmente, são detectados títulos baixos de anticorpos específicos, que podem mesmo estar ausentes, e os animais apresentam recuperação espontânea (Rolão *et al.*, 2005; Pereira, 2008).

Apesar da Leishmaniose felina ser considerada rara, nos últimos anos ocorreu um aumento no número de casos relatados em todo o Mundo, sendo uma consequência provável da crescente preocupação com a saúde animal e da evolução das técnicas de diagnóstico. Contudo, ainda há pouca informação conclusiva sobre a prevalência, a transmissão do protozoário ao vector, a susceptibilidade felina e a importância dos gatos na transmissão da Leishmaniose (Simões-Mattos, Bevilaqua, Mattos & Pompeu, 2004). Esta doença foi identificada nos gatos em vários países, nomeadamente Portugal, Espanha, Itália, França, Suíça, Brasil, Estados Unidos da América e Argélia, e as espécies parasitárias envolvidas incluem *L. infantum*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* (Baneth, 2006; Pereira, 2008).

Os sintomas de Leishmaniose felina são variados, consistindo maioritariamente em lesões nodulares e/ou ulcerativas cutâneas, sobretudo na cabeça, semelhantes a outras doenças, como o granuloma eosinofílico ou o carcinoma espinocelular, sendo rara a forma visceral (Carvalho, Pereira & Sanches, 2011). Alguns dos animais afectados apresentam doenças imunossupressoras, como o FIV e/ou o FeLV, que podem reduzir a resposta imunitária de tipo celular (Baneth, 2006; Pereira, 2008). Vários estudos têm demonstrado que a resposta

imunitária felina à *Leishmania* difere da canina, uma vez que nos gatos existe menor quantidade de anticorpos específicos, sugerindo a presença de resistência natural à infecção nesta espécie. Esta resistência pode ainda estar relacionada com factores genéticos (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Pereira, 2008).

### **2.3. Ciclo biológico e Transmissão**

As espécies de *Leishmania* têm um ciclo de vida heteroxeno, ou seja, uma parte do seu desenvolvimento ocorre no hospedeiro invertebrado, um flebótomo do género *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, que é responsável pela transmissão do protozoário ao hospedeiro vertebrado (Tomás & Romão, 2008).

A infecção vectorial ocorre quando o flebótomo fêmea efectua uma refeição sanguínea contendo macrófagos com as formas amastigotas de *Leishmania*, que posteriormente irão sofrer um processo de diferenciação no aparelho digestivo do insecto. A maioria das espécies de *Leishmania* do sub-género *Leishmania* tem um desenvolvimento suprapilárico, isto é, ocorre no estômago do flebótomo, enquanto que as espécies do sub-género *Viannia*, são parasitas peripiláricos, ou seja, invadem o intestino posterior antes de migrarem para o estômago do insecto (Afonso & Alves-Pires, 2008; Tomás & Romão, 2008).

Durante o processo de diferenciação, o parasita passa por diversas formas intermediárias, que são morfológica e fisiologicamente diferentes. Nas primeiras 24 a 48 horas, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicos, ocorrendo a primeira multiplicação parasitária intravectorial (divisão binária). Estes apresentam um pequeno flagelo, são resistentes às enzimas digestivas e estão separados do epitélio gástrico pela membrana peritrófica, uma estrutura constituída por quitina e outras glicoproteínas, que envolve o sangue digerido. Ao fim de 48 a 72 horas, as formas procíclicas transformam-se em promastigotas nectomonas, compridos e delgados, que iniciam a migração do parasita para a região anterior do estômago, onde se ligam às células epiteliais gástricas. Nesta altura, a membrana peritrófica já não é necessária, sendo destruída por quitinases secretadas pelo protozoário e pelo insecto. Posteriormente (4-7 dias), os nectomonas diferenciam-se em promastigotas leptomonas, formas curtas que realizam a segunda multiplicação intravectorial. Cinco a sete dias após a refeição sanguínea, os leptomonas transformam-se em promastigotas metacíclicos e haptomonas, que não têm capacidade de divisão celular e se localizam na válvula estemodeal, situada entre a região anterior do aparelho digestivo e o estômago torácico. Os haptomonas têm um pequeno flagelo, não são móveis e fixam-se à válvula estemodeal, provocando a sua degenerescência. Este facto permite que os promastigotas

metacíclicos, formas infectantes providas de um longo flagelo, se deslocam até à cavidade oral do flebótomo, sendo transmitidos ao hospedeiro vertebrado, aquando de uma nova refeição. O processo de desenvolvimento de *Leishmania* spp., em espécies flebotomínicas susceptíveis, culmina ao fim de 6 a 10 dias (Afonso & Alves-Pires, 2008; Tomás & Romão, 2008).

As alterações sofridas na válvula estemodeal, juntamente com a oclusão do tracto digestivo causada pelos parasitas, impedem o insecto de efectuar refeições completas, conduzindo-o a picar vários hospedeiros sucessivamente, na tentativa de obter a quantidade de sangue de que necessita, o que maximiza a sua capacidade infectante (Tomás & Romão, 2008). Quando o flebótomo pica um hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas são inoculadas na pele, por regurgitação, devido à degenerescência da válvula estemodeal. Mais raramente, a inoculação cutânea do protozoário pelo vector é atribuída a outros mecanismos, como a invasão da probóscide ou das glândulas salivares do insecto pelos promastigotas metacíclicos, sendo, neste último caso, inoculados juntamente com saliva (Killick-Kendrick, 2002). Esta contém componentes anticoagulantes, péptidos vasodilatadores e enzimas com propriedades anti-inflamatórias, anti-hemostáticas e anestésicas, que facilitam a transmissão do parasita e amplificam a infecção no hospedeiro (Mencke, Volf, Volfova & Stanneck, 2003; Roze, 2005). Como foi referido anteriormente, a competência vectorial do flebótomo parece estar relacionada com a capacidade dos promastigotas se ligarem especificamente a receptores, no tracto digestivo dos insectos. Quando estas ligações não ocorrem os parasitas, após se replicarem, são excretados juntamente com as fezes do flebótomo (Baneth, 2006). Deste modo, o protozoário *Leishmania* é considerado mais específico para o vector do que para o hospedeiro vertebrado (Bourdeau, 2009).

No hospedeiro vertebrado, após a inoculação, os promastigotas são fagocitados por macrófagos e células dendríticas da pele. Contudo, as formas metacíclicas evadem estes mecanismos de defesa não específica e transformam-se em amastigotas (Bourdeau, 2009). Estas formas parasitárias multiplicam-se, através de divisão binária, no interior dos macrófagos, até provocarem a sua ruptura, infectando de seguida novas células do SMF. Deste modo, o protozoário não fica confinado na pele, sendo transportado, através do sangue e linfa, o que permite a sua disseminação por todo o organismo do hospedeiro, mas, principalmente, até aos órgãos do sistema hemolinfático como o fígado, o baço, a medula óssea e os linfonodos. O parasita, ao estar presente na circulação sistémica, pode ser ingerido pelos flebótomos durante a refeição sanguínea (Baneth, 2006; Tsachev *et al.*, 2008). Nos mamíferos, como por exemplo o cão, os locais preferenciais para a picada do insecto incluem o focinho, as orelhas, a região periocular e o abdómen por terem pouco pêlo e assim

facilitarem a ingestão de sangue (Mencke *et al.*, 2003). É de salientar que não são apenas os cães sintomáticos os responsáveis pela infecção dos flebótomos, uma vez que também os animais assintomáticos, isto é, que não manifestam sinais clínicos, têm a capacidade de infectar os vectores (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008).

Apesar do parasita *Leishmania* apresentar várias estratégias para limitar a acção microbicida do macrófago, o hospedeiro vertebrado consegue, muitas vezes, impedir o estabelecimento do protozoário e/ou interferir no seu desenvolvimento, dependendo da capacidade para montar uma resposta imunitária adequada (Tomás & Romão, 2008). Deste modo, é possível compreender porque a maioria dos casos relatados de Leishmaniose humana ocorre em crianças ou em indivíduos adultos com o vírus da imunodeficiência humana/síndrome de imunodeficiência adquirida (VIH/SIDA) ou sujeitos a medicação citostática e imunossupressiva (Baneth, 2006).

Embora os flebótomos sejam os únicos vectores de Leishmaniose biologicamente adaptados, existem outros ectoparasitas hematófagos, como os ixodídeos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* e as pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*, que poderão estar implicados na transmissão de *Leishmania* (Baneth *et al.*, 2008). Estudos recentes permitiram constatar que a infecção das carraças e pulgas ocorre após a ingestão de sangue de cães infectados com o protozoário, tendo sido possível verificar que a inoculação, por via oral ou intraperitoneal, de homogeneizados destes ectoparasitas conduz à infecção em roedores. Contudo, apesar de estes resultados sugerirem que a ingestão de carraças e pulgas infectadas pode ser uma via alternativa de transmissão de *Leishmania* para os canídeos, ainda não foi comprovada a sua competência vectorial e o seu verdadeiro papel na epidemiologia da Leishmaniose canina (Coutinho & Linardi, 2007; Dantas-Torres *et al.*, 2010).

A transmissão congénita da Leishmaniose foi notificada em humanos e tem sido estudada em laboratório, utilizando ratos como modelo. Este tipo de transmissão foi demonstrado, experimentalmente, em cachorros descendentes de pais infectados, considerando-se que ocorreu por via transplacentária. Por outro lado, já foi detectado ADN de *Leishmania* spp. em lesões dos órgãos genitais e sémen de cães naturalmente infectados, sugerindo a possibilidade de transmissão venérea (Bourdeau, 2009).

A transfusão sanguínea também foi demonstrada como possível via de transmissão do protozoário *Leishmania* ao Homem e ao cão, tendo especial importância nas áreas endémicas, onde os doadores de sangue podem ser portadores do parasita (Bourdeau, 2009). Estudos demonstraram que a partilha de agulhas entre humanos, durante a administração endovenosa de fármacos, também favorece a transmissão de *Leishmania* (Baneth, 2006).

Como forma de explicar a ocorrência de focos da doença em zonas não-endémicas, onde os vectores biológicos estão aparentemente ausentes, foi proposta a transmissão directa entre cães, por exemplo através de mordedura, não havendo ainda evidências experimentais que o confirmem (Bourdeau, 2009). Por outro lado, têm sido reportados casos esporádicos de Leishmaniose canina causada pela importação ou transporte de cães infectados para países onde a transmissão por flebótomos não ocorre, como Holanda, Inglaterra e Suécia (Baneth, 2006).

No entanto, todos estes processos de transmissão de *Leishmania* sem intervenção de um flebótomo, carecem de mais investigações porque a sua importância na epidemiologia da Leishmaniose canina ainda não está completamente esclarecida (Baneth *et al.*, 2008).

#### **2.4. Epidemiologia da Leishmaniose canina em Portugal**

A Leishmaniose é uma doença endémica em 88 países, 66 no Velho Mundo e 22 no Novo Mundo. A sua distribuição geográfica é heterogénea, ocorrendo em focos, com grandes variações de prevalência entre regiões contíguas, sendo influenciada pela presença de condições ecológicas apropriadas ao desenvolvimento do vector (Baneth, 2006; Pereira, 2008). A actividade flebotomínica poderá prolongar-se com as alterações climáticas que se estão a verificar, nomeadamente o aumento da temperatura com invernos menos rigorosos, tendo como consequência o aumento da transmissão do parasita e, concomitantemente, da incidência da doença (Campino & Maia, 2010). É de salientar que, nos últimos anos, tem havido um número crescente de cães infectados por *Leishmania* em zonas não-endémicas, muitas vezes associado a importação ou deslocação dos animais de países endémicos. No entanto, este aumento pode também resultar da alteração da biologia dos flebótomos, consequente do aquecimento global, na medida em que a latitude máxima na Europa onde estes vectores eram encontrados se está a deslocar para Norte (Roze, 2005; Baneth *et al.*, 2008).

Os estudos epidemiológicos da Leishmaniose recorrem sobretudo a análises serológicas, uma vez que o diagnóstico sintomatológico é insuficiente porque existe um elevado número de cães assintomáticos nas zonas endémicas (50-60%). Os resultados destes estudos sugerem a presença de cerca de 2,5 milhões de cães infectados nos países do Sul da Europa e as seguintes seroprevalências na Bacia Mediterrânica: na Turquia 65-76%, no Chipre 1,7-10%, em Israel 3,6-15%, na Grécia 3,7-38,8%, na Albânia 12,9%, em Itália 22,1-30,3%, em Malta 28,9-52%, em França 10-40%, em Espanha 3-35% e em Portugal 6-20,4% (Baneth, 2006; Tsachev *et al.*, 2008). No entanto, a seroprevalência pode subestimar a quantidade real de

animais infectados, sendo benéfica a utilização de técnicas de biologia molecular, como a Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) que detecta o ADN do protozoário (Baneth, 2006; Pereira, 2008). O agente responsável pela maioria dos casos de Leishmaniose humana e canina, nos países da Bacia do Mediterrâneo, é o zimodeme MON-1 de *L. infantum*. No entanto, outros zimodemes dessa espécie parasitária foram identificados em cães da zona Mediterrânea, nomeadamente MON-11, MON-77, MON-108, MON-98, MON-27, MON-34, MON-37, MON-105 e MON-199 (Solano-Gallego, 2001).

Em Portugal, no ano de 1911, Álvares e Pereira da Silva registaram, pela primeira vez, a existência de cães parasitados por *Leishmania*, na região Metropolitana de Lisboa. Posteriormente, na década de 80 e 90, foram identificados três principais focos endémicos de Leishmaniose canina, nomeadamente a região de Trás-os-Montes e Alto Douro, a região Metropolitana de Lisboa e o Algarve. O número de casos de cães com Leishmaniose em Portugal tem vindo a aumentar e, actualmente, para além das regiões consideradas endémicas, ocorrem casos esporádicos desta doença em quase todo o país (Cortes, 2008; Pereira, 2008). A Leishmaniose canina é uma zoonose emergente, estando incluída, desde 2002, no grupo das doenças de notificação obrigatória (Campino & Maia, 2010).

Estudos epidemiológicos realizados, na década de 80, permitiram identificar na região Norte do país uma prevalência da infecção canina entre 10 e 12,4%, com a localidade de Vale de Mendiz, no Concelho de Alijó, a apresentar 37,8% dos animais infectados (Abranches *et al.*, 1992, citados por Pereira, 2008). Num estudo realizado recentemente (Cardoso *et al.*, 2004), verificou-se uma seroprevalência de 18,7% no concelho de Alijó. Neste foco endémico o zimodeme encontrado nos canídeos foi MON-1, com excepção de um cão onde foi isolado MON-98. O insecto vector mais frequente era da espécie *P. ariasi*, apesar de também estar presente a espécie *P. perniciosus*. Nestes flebótomos os zimodemes isolados foram MON-1 e MON-24 (Pereira, 2008).

A região de Lisboa e Vale do Tejo é composta pelo ecossistema urbano/suburbano, localizado na área de influência directa das cidades de Lisboa e Setúbal, e pelo ecossistema rural, situado na parte sul da península de Setúbal e que inclui o Parque Natural da Arrábida (Pereira, 2008). Durante a década de 80, a parte urbana da região foi caracterizada por uma moderada prevalência de Leishmaniose canina (3,8%), enquanto que a componente rural apresentou valores mais elevados (8,8%) (Abranches *et al.*, 1987, citados por Pereira, 2008). Nos últimos anos, tem-se assistido a um aumento da Leishmaniose canina também na região Metropolitana de Lisboa uma vez que em estudos recentes (Cortes, Afonso, Alves-Pires & Campino, 2007) foi encontrada uma prevalência de 19,2%. Na península de Setúbal foram identificadas raposas parasitadas, nas quais a prevalência da doença foi 5,6% (Pereira, 2008). Deste modo,

o ecossistema rural é mais heterogêneo que o urbano, na medida em que engloba o ciclo doméstico, no qual o cão é o hospedeiro reservatório, e o ciclo silvático, com a raposa como reservatório. Nestas espécies de canídeos as estirpes de *Leishmania* isoladas pertenciam ao zimodeme MON-1 e os vectores encontrados na região eram *P. ariasi* e *P. perniciosus* (Pereira, 2008).

Na década de 90, estudos epidemiológicos realizados no Algarve indicaram uma prevalência média de Leishmaniose canina de 7% (Campino *et al.*, 1995, citados por Pereira, 2008). O agente etiológico isolado era também *L. infantum* (MON-1) e a principal espécie de flebótomo envolvida na transmissão foi *P. perniciosus* (Pereira, 2008). Em 2006 realizou-se nesta região do país um novo estudo de seroprevalência da Leishmaniose canina, tendo-se detectado valores significativos de anticorpos anti-*Leishmania* em 28,8% dos animais estudados (Campino & Maia, 2010).

No distrito de Évora, a seroprevalência observada foi de 3,9% e, ao contrário dos outros focos endémicos onde predominam os vectores *P. ariasi* e *P. perniciosus*, neste distrito parece dominar a espécie *P. sergenti* (Semião-Santos *et al.*, 1995, citados por Pereira, 2008). Recentemente, tem sido referido um aumento do número de casos de Leishmaniose canina nesta região de Portugal (Pereira, 2008).

No nosso país, o primeiro caso de Leishmaniose humana foi descrito em 1910, por Dionísio Álvares, numa criança residente em Lisboa. Em Portugal, como nos outros países do Sul da Europa, a doença tem sido considerada predominantemente infantil, havendo um aumento da infecção em adultos, principalmente associada a casos de VIH/SIDA (Campino & Maia, 2010). Do mesmo modo que foi referido nos canídeos, ocorrem casos esporádicos em todo o país, podendo considerar-se três zonas endémicas principais: a região do Alto Douro, a região Metropolitana de Lisboa e o Algarve (Campino *et al.*, 2006). Nos últimos anos, a maioria dos casos notificados provêm da região de Lisboa e Vale do Tejo, no Norte de Portugal ocorreu apenas um reduzido número de casos e no Algarve não tem havido notificação de Leishmaniose humana. De acordo com a Unidade de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, estes valores parecem estar muito subestimados, uma vez que o número de casos diagnosticados na Unidade é superior ao que tem sido oficialmente declarado (Cortes, 2008). No período de 2000 a 2009 foram identificados laboratorialmente, nesse Instituto, 173 novos casos da forma visceral da doença, em humanos. A Leishmaniose cutânea ainda é, de um modo geral, pouco conhecida em Portugal, mas têm sido descritos casos, desde os anos 40, nas bacias hidrográficas dos rios Douro, Tejo e Sado. A única espécie até agora isolada em Portugal, no Homem, foi *L. infantum* e os zimodemes identificados foram

predominantemente MON-1, mas também MON-24, MON-29 e MON-80 (Campino *et al.*, 2006; Campino & Maia, 2010).

Apesar de alguns estudos mostrarem uma relação directa entre as prevalências da Leishmaniose canina e humana, de um modo geral a doença nos canídeos é mais prevalente e mais amplamente distribuída que nos humanos (Cortes *et al.*, 2007). No entanto, a presença de cães infectados desempenha um papel fundamental na manutenção da doença no Homem. Em Portugal, como em outros países da Europa do Sul, a Leishmaniose foi considerada durante muito tempo uma doença rural, mas tem-se tornado cada vez mais prevalente nas áreas urbanizadas. O desenvolvimento não planeado das áreas suburbanas contribui para o aumento de resíduos sólidos, que atraem os cães errantes, alvos fáceis para a picada do flebótomo, com consequente transmissão de *Leishmania* (Campino & Maia, 2010). O estudo realizado por Cortes *et al.* (2007), no ecossistema urbano/suburbano de Lisboa, permitiu acentuar a importância destes animais errantes na transmissão da doença, uma vez que a sua prevalência de infecção foi 21,6% contra 18,4% nos cães domésticos. Parece existir um maior número de casos nos cães domésticos que habitam em áreas suburbanas da região de Lisboa, o que pode estar associado à crescente construção de casas com jardim nessa localidade, onde os animais permanecem grande parte do dia, favorecendo assim a exposição ao flebótomo (Cortes *et al.*, 2007). Por outro lado, sendo o insecto vector predominantemente zoofílico, se houver um menor número de animais disponíveis nas zonas urbanas, a população humana pode tornar-se mais vulnerável à infecção acidental (Campino & Maia, 2010).

Em Portugal Continental, foi efectuado um estudo por Neves, Cardoso, Afonso e Campino (2007) com o objectivo de determinar o grau de conhecimento dos proprietários dos cães sobre a Leishmaniose. Verificou-se que 40 a 70% dos donos não reconheciam a doença, 55 a 80% não sabiam qual o resultado do tratamento, 60 a 75% não conheciam as formas de prevenção, 70 a 85% não sabiam os sinais clínicos típicos e 75 a 90% desconheciam que se trata de uma zoonose. Apenas 6 a 12% dos proprietários inquiridos demonstraram conhecer, satisfatoriamente, esta doença, sobretudo os que habitavam nas áreas urbanas ou em locais de maior risco de infecção para os cães (Neves, Cardoso, Afonso & Campino, 2007).

Devido ao considerável desconhecimento da maioria da população portuguesa sobre a Leishmaniose e à inexistência de um plano nacional de diagnóstico e controlo, foi criado em 2008, o Observatório Nacional das Leishmanioses (ONLeish). Os seus principais objectivos são a implementação e manutenção de uma rede epidemiológica da doença e o desenvolvimento de uma colaboração estreita entre os profissionais de saúde, incluindo os Médicos Veterinários (Campino & Maia, 2010). O primeiro estudo em larga escala promovido pelo ONLeish ocorreu em 2009, onde se procurou avaliar, durante uma semana, a

seroprevalência em todo o país, permitindo assinalar um nível de seropositividade global de aproximadamente 6%. Foi também possível constatar uma elevada seroprevalência (10-16%) nos distritos de Castelo Branco, Portalegre e Beja, seguidos pelos distritos de Lisboa, Santarém, Coimbra, Viseu, Guarda, Bragança e Vila Real, que apresentavam valores compreendidos entre 5-10%. Em 2010, na sequência deste estudo, o ONLeish apresentou aos Centros de Atendimento Médico-Veterinário (CAMV), a LEISHnet, uma rede de vigilância epidemiológica da Leishmaniose canina, que pretende conhecer a situação real desta doença a nível nacional. Os resultados preliminares, relativos aos primeiros seis meses de funcionamento da LEISHnet, foram divulgados no início do presente ano, admitindo-se contudo que a amostra populacional representada ainda não traduz a realidade nacional, uma vez que pouco mais de 11% dos CAMV portugueses reportaram casos durante o período de estudo considerado (Observatório Nacional das Leishmanioses [ONLeish], 2011).

### **3. PATOGENIA E SUSCEPTIBILIDADE**

A gravidade da Leishmaniose canina é condicionada por diversos factores, como as características genéticas do hospedeiro e do parasita e o estado nutricional e de saúde do animal, que são, por sua vez, determinantes na eficácia da resposta imunológica. A variabilidade destes factores é a principal responsável pela susceptibilidade ou resistência do animal, sendo a resposta imunitária considerada fundamental no desenvolvimento do processo infeccioso e no estabelecimento da doença (Santos-Gomes, Rodrigues & Marques, 2008).

A **imunidade inata ou inespecífica** constitui a primeira linha de defesa do organismo contra a infecção por *Leishmania*, envolvendo a actividade de células fagocitárias, como os macrófagos e os neutrófilos, e de mediadores celulares inflamatórios. Na derme do hospedeiro, o local de inoculação dos promastigotas pelo flebótomo, são os neutrófilos as primeiras células fagocitárias identificadas, tentando destruir rapidamente os agentes patogénicos. Posteriormente, ocorre uma infiltração de macrófagos, as células fagocitárias principais, que têm como função secundária apresentar antígenos estranhos ao organismo, juntamente com as células dendríticas presentes em diversos órgãos e tecidos, sendo por isso designados de células apresentadoras de antígenos (APC). Por outro lado, os linfócitos são a segunda subpopulação celular mais frequente nas lesões dérmicas do hospedeiro (Santos-Gomes *et al.*, 2008).

Imediatamente após a inoculação de promastigotas na pele do animal, ocorre a activação do sistema complemento, que vai favorecer a ligação dos factores do complemento ao parasita. Com essa activação formam-se também produtos de clivagem, que atraem os macrófagos para

a área de infecção, por quimiotaxia, e induzem a expressão de receptores do complemento (CR) naquelas células. A maioria dos promastigotas é destruída pelo sistema complemento, que induz lesão nas membranas celulares do parasita e causa, conseqüentemente, a sua lise (Santos-Gomes *et al.*, 2008).

Por outro lado, as formas parasitárias sobreviventes exploram a capacidade de fagocitose das células imunitárias, com o objectivo de atingir as células hospedeiras. A fagocitose é sempre iniciada com a adesão de *Leishmania* às células fagocitárias, o que pode suceder através da ligação directa das moléculas do protozoário aos receptores celulares do animal ou, alternativamente, o parasita é primeiro opsonizado por proteínas do hospedeiro (opsoninas), como o complemento ou os anticorpos, e só depois é reconhecido por receptores celulares específicos (Tomás & Romão, 2008). As principais opsoninas utilizadas pelos promastigotas parecem ser os factores do complemento C3b e C3bi, que se fixam respectivamente aos receptores do complemento tipo I (CR1, CD35) e III (CR3, CD11b/CD18) dos macrófagos (Ferrer, 2002b; Reis, Brito, Souza & Pereira, 2006). Na superfície da *Leishmania* existem várias moléculas com a capacidade de fixar opsoninas e de se ligar directamente às proteínas do macrófago, nomeadamente a glicoproteína 63 (Gp63) e o lipofosfoglicano (LPG) (Ferrer, 2002b; Tomás & Romão, 2008). A Gp63 transforma o factor C3b em C3bi, que é incapaz de activar o complemento e que, revestindo o protozoário, permite a sua entrada no macrófago. O LPG, por sua vez, desempenha diversas funções no desenvolvimento do parasita no vector e em algumas espécies de *Leishmania*, nomeadamente *L. donovoni*, participa também na penetração das células hospedeiras, aceitando factores do complemento e ligando-se directamente ao CR3 (Tomás & Romão, 2008).

Na zona de internalização forma-se um fagossoma, onde ocorre a diferenciação do promastigota metacíclico em amastigota. Após o aparecimento desta forma parasitária, o fagossoma funde-se com os lisossomas, os vacúolos digestivos do macrófago, transformando-se em fagolisossoma, onde o parasita encontra um ambiente hostil destinado à sua destruição (Tomás & Romão, 2008).

Os macrófagos possuem vários mecanismos de destruição das células fagocitadas, nomeadamente a explosão respiratória, a acidificação e a digestão. A explosão respiratória, o principal mecanismo leishmanicida, conduz à formação de radicais livres de oxigénio (compostos oxidativos) pela acção da NADPH oxidase, como o peróxido de hidrogénio e o ião superóxido, conduzindo também à síntese do monóxido de azoto (NO) a partir da L-arginina e do oxigénio, durante a reacção catalisada pela sintase do monóxido de azoto (NOs). Esta enzima apresenta três formas, codificadas por diferentes genes regulados por várias vias de sinalização, destacando-se a sintase induzida do monóxido de azoto (iNOs), cuja produção

está dependente da presença de interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e de factor de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Os macrófagos caninos activados e infectados por *Leishmania* são capazes de produzir maior quantidade de iNOs do que os macrófagos infectados mas não activados. Por outro lado, nos neutrófilos e nos monócitos a produção do ião superóxido parece ser maior que a síntese de NO (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Santos-Gomes *et al.*, 2008). Estes produtos oxidativos causam a peroxidação dos ácidos gordos da membrana do protozoário e malformações cromossómicas que desencadeiam a sua morte (González, 2007). O processo de acidificação, por sua vez, permite a redução do pH no interior do macrófago, favorecendo a desnaturação das proteínas, que assim se tornam susceptíveis às hidrolases ácidas, intervenientes no processo de digestão. Estas enzimas de capacidade hidrolítica libertam-se dos lisossomas aquando da formação dos fagolisossomas, degradando proteínas, carboidratos, ADN e RNA (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Santos-Gomes *et al.*, 2008).

Contudo, o protozoário apresenta diversas estratégias que lhe permitem resistir aos mecanismos leishmanicidas das células fagocitárias do hospedeiro. A primeira estratégia do promastigota é evitar a lise directa pelo sistema complemento, através de uma reacção de fosforilação que permite a inactivação de componentes desse sistema, como o C3, C5 e C9, e onde actuam a Gp63 e o LPG, os principais factores de virulência do parasita (Reis *et al.*, 2006).

Por outro lado, a selecção de determinados receptores por parte do parasita conduz a uma cascata de reacções de sinalização, essencial para infectar com sucesso o hospedeiro vertebrado, como é provado pela baixa produção de radicais de oxigénio no macrófago parasitado, quando ocorre ligação preferencial do promastigota ao CR3, facilitando assim a sua sobrevivência (Tomás & Romão, 2008).

O LPG do protozoário, por sua vez, impede que a fusão fagossoma-lisossoma aconteça antes da diferenciação da forma promastigota em amastigota, sendo posteriormente degradado porque a sua presença se torna prejudicial ao parasita. Nos fagolisossomas os amastigotas encontram um ambiente ácido e enzimático que, apesar de se considerar adverso ao seu desenvolvimento, pode tornar-se compatível com a sua sobrevivência. Estas formas do protozoário apresentam diferentes enzimas com actividade óptima no pH do fagolisossoma (pH 5 a 6) e têm a capacidade de regular o pH intracelular, mantendo-o neutro, através de um protão-ATPase presente na sua membrana celular (Tomás & Romão, 2008).

Uma vez assegurada a sua sobrevivência torna-se necessário o aporte de diversas moléculas, que depois de processadas, podem ser utilizadas na replicação dos amastigotas. Deste modo, iões, moléculas pequenas, como a glucose e os aminoácidos, e macromoléculas, como péptidos e moléculas da classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC-II), são

transferidos do macrófago para o lúmen do fagolisossoma e aproveitados pelo protozoário. As moléculas do MHC-II permitem ao parasita impedir a apresentação dos seus antígenos e assim favorecem a evasão à resposta imunitária do hospedeiro (Tomás & Romão, 2008).

No entanto, as moléculas do MHC-II não têm apenas a função de apresentar as fracções antigénicas parasitárias à superfície do macrófago, sendo também as responsáveis pela sinapse imunológica. Esta é um processo complexo constituído por três fases: o reconhecimento, pelos receptores dos linfócitos T (TCR), das fracções antigénicas associadas ao MHC e localizadas na superfície das APC, a ligação entre os macrófagos e os linfócitos e a activação dos linfócitos T. A terceira fase está dependente da ligação estável entre os dois tipos celulares, para a qual é importante a intervenção de moléculas de co-estimulação nos macrófagos e nos linfócitos T. Nos macrófagos caninos parasitados por *Leishmania* existe uma redução da expressão daquelas moléculas, dificultando a estabilidade da ligação e, conseqüentemente, prejudicando o processo de activação linfocitária e a produção de citocinas, indutoras da actividade leishmanicida dos macrófagos (Santos-Gomes *et al.*, 2008).

É importante referir ainda que se verificou, em algumas espécies de *Leishmania*, a capacidade de sobreviver em neutrófilos, durante o período de tempo em que decorre a infiltração do local de infecção por macrófagos. Deste modo, a entrada do protozoário nos macrófagos ocorre através da fagocitose dos neutrófilos, não sendo assim activada a sua acção leishmanicida, uma vez que esta fagocitose se enquadra nos processos normais macrofágicos de remoção de células “self” envelhecidas (Tomás & Romão, 2008).

As células dendríticas, como as células de Langerhans da pele, têm capacidade fagocitária e são eficientes apresentadoras de antígenos, contribuindo para a interacção entre as respostas imunológicas inata e adquirida desenvolvidas na presença do agente patogénico. Após fagocitarem os protozoários deslocam-se da pele para o linfonodo eferente, onde expressam à sua superfície as fracções antigénicas associadas ao MHC-II, estimulando os linfócitos T e dando início à resposta imunológica adquirida. Os queratinócitos também expressam MHC-II e libertam citocinas após activação, influenciando o processo de inflamação na pele e a destruição do parasita (Santos-Gomes *et al.*, 2008). Para evadir o sistema de defesa do hospedeiro o protozoário também é capaz de modular a capacidade de migração das células dendríticas para os órgãos linfóides, interferir na produção de citocinas e na expressão de receptores nessas células, alterando assim a comunicação entre as respostas imunitárias inata e a adquirida (Bueno, 2006).

O comportamento de sobrevivência intracelular do parasita *Leishmania* pode permitir a sua multiplicação no interior dos macrófagos até haver destruição das células parasitadas, com a

sua consequente libertação e disseminação para outros órgãos, como a medula óssea, os linfonodos, os rins, o baço e o fígado (Alexandre-Pires & Correia, 2008). Deste modo, a acção da imunidade inata, no início da infecção, é um factor determinante na contenção da disseminação do protozoário (Santos-Gomes *et al.*, 2008).

Sempre que a eliminação ou neutralização de *Leishmania* pela resposta imunológica inata falha, é activada a **imunidade adquirida ou adaptativa**, que desenvolve estratégias defensivas específicas para o agente etiológico, memorizando a ocorrência da infecção. Neste tipo de resposta imunitária participam os linfócitos B e T, os anticorpos e diversos mediadores celulares como as citocinas (Santos-Gomes *et al.*, 2008).

Nem todos os animais infectados por *Leishmania* desenvolvem a doença. Os cães que têm a capacidade de resistir à infecção, através da eliminação do parasita, ou que a restringem, permanecendo assintomáticos, são designados de clinicamente resistentes. Os animais predispostos ao desenvolvimento da infecção e da sintomatologia da doença são considerados susceptíveis, podendo conseguir controlar a infecção espontaneamente ou evoluir para uma situação de doença crónica (Baneth, 2006). Estudos realizados em modelos experimentais permitiram demonstrar que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* está dependente do predomínio de duas subpopulações de linfócitos T *helper* CD4<sup>+</sup>: linfócitos T *helper* 1 (Th1) e linfócitos T *helper* 2 (Th2), respectivamente. Assim sendo, após a apresentação das fracções antigénicas do protozoário pelas APC aos linfócitos T, ocorre a activação e diferenciação das células Th virgens em linfócitos Th1, envolvidos no desenvolvimento de uma resposta imunitária celular protectora, ou em linfócitos Th2, associados a uma resposta imunitária humoral, responsável pela progressão e persistência da doença (Roze, 2005; González, 2007). Contudo, em canídeos e humanos naturalmente infectados por *Leishmania* esta dicotomia Th1/Th2 não é clara, uma vez que se tem verificado que nestes hospedeiros o protozoário induz os dois tipos de resposta imunológica, sendo o controlo da replicação do parasita, a progressão da doença ou a sua resolução, determinados pelo balanço entre ambas as respostas (Roze, 2005; Baneth *et al.*, 2008). Deste modo, os cães sintomáticos apresentam, regra geral, uma forte resposta imunológica humoral e imunossupressão da resposta celular específica, enquanto os animais assintomáticos demonstram ter resposta celular específica e fraca resposta humoral. No entanto, é importante reforçar que esta dicotomia não é absoluta, uma vez que alguns cães possuem respostas mistas, possivelmente consequência da virulência da estirpe do protozoário, dos factores intrínsecos e extrínsecos característicos do animal e do tempo de duração da infecção (Santos-Gomes *et al.*, 2008). Por outro lado, tem-se verificado que as moléculas contidas na saliva dos flebótomos, como proteínas, enzimas e prostaglandinas, além de possuírem propriedades

anticoagulantes e vasodilatadoras, actuam na supressão da resposta inflamatória e na modulação de citocinas, podendo assim bloquear a resposta imunológica do tipo Th1 e estimular a do tipo Th2 (Roze, 2005; Reis *et al.*, 2006).

Nos animais resistentes, as células dendríticas e macrófagos produzem interleucina-12 (IL-12), uma citocina que permite que os linfócitos T se diferenciem na subpopulação Th1. Estas células, por sua vez, produzem IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e interleucina-2 (IL-2) que activam os macrófagos e os estimulam a sintetizar substâncias tóxicas para o parasita, como os radicais livres de oxigénio e o NO. Alguns estudos demonstraram também o envolvimento de linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> na resistência à Leishmaniose canina, sugerindo que estas células são responsáveis pela lise dos macrófagos infectados com *Leishmania* e pelo aumento da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Barbiéri, 2006; Bueno, 2006).

Por outro lado, nos animais susceptíveis ocorre a produção de interleucina-4 (IL-4) pelos linfócitos T, desencadeando o desenvolvimento da subpopulação Th2. Esta diferença imunológica contribui para a inibição de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12, diminuição da expressão de receptores para a IL-12 nos linfócitos, interdição da síntese de NO pelos macrófagos e redução do número de linfócitos T, cuja capacidade de proliferação em resposta aos antígenos de *Leishmania* está igualmente diminuída. Além disso, os macrófagos infectados não apresentam a acção adequada como APC porque as suas moléculas de co-estimulação não promovem a ligação estável entre o TCR nos linfócitos e o MHC-II nos macrófagos. É de salientar ainda que as interleucinas 5 (IL-5), 6 (IL-6), 10 (IL-10) e 13 (IL-13) são também sintetizadas na resposta Th2, estimulando os linfócitos B a produzir anticorpos (Barbiéri, 2006; Bueno, 2006). Contudo, na Leishmaniose canina o envolvimento da IL-10 na ocorrência da doença é ainda controverso uma vez que, nos estudos realizados, a sua produção esplénica e hepática tem sido idêntica em cães naturalmente infectados, sintomáticos e assintomáticos (Barbiéri, 2006; Santos-Gomes *et al.*, 2008). Assim sendo, a IL-10 é considerada um regulador da actividade Th1, mantendo o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 e inibindo ainda a acção leishmanicida dos macrófagos infectados (Baneth *et al.*, 2008).

A Leishmaniose canina está frequentemente associada a uma resposta humoral marcada, que não sendo protectora, representa a falha no controlo da infecção. Neste tipo de resposta, os linfócitos B são activados pelo contacto directo com as fracções antigénicas do protozoário, diferenciando-se em células plasmáticas, secretoras de anticorpos ou imunoglobulinas (Ig). Existem várias classes ou isotipos de anticorpos, como IgA, IgD, IgE, IgM e IgG, apresentando este último isotipo quatro subclasses, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A produção de anticorpos específicos tem início nas primeiras semanas pós-infecção e segue uma cinética

crescente, sendo os seus níveis séricos consideráveis por volta das 8 a 12 semanas. Os níveis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania*, nomeadamente de IgG, detectados nos animais sintomáticos foram maiores que os dos cães assintomáticos (Campillo *et al.*, 1999; Baneth *et al.*, 2008; Santos-Gomes *et al.*, 2008). Por outro lado, a correlação entre o tipo de resposta Th1/Th2 e as classes ou subclasses de imunoglobulinas tem sido largamente estudada, verificando-se que a secreção de IgA e IgE são determinadas pela produção de IL-5 e IL-4 pelas células Th2, respectivamente, a IgM é induzida por ambos os tipos de células Th e a produção de IgG2 e IgG3 é desencadeada pelas células Th1, através de IFN- $\gamma$ , enquanto a produção de IL-4 pelas células Th2 induz a síntese de IgG1 e IgG4. Contudo, estes resultados não são lineares uma vez que estudos recentes revelam alguma discrepância quanto à correlação entre as classes/subclasses de anticorpos e a presença/ausência de sintomatologia (Barbiéri, 2006; González, 2007; Reis *et al.*, 2009).

Nos animais susceptíveis, a intensa activação de linfócitos B e produção de anticorpos desencadeia a presença significativa de complexos imunes circulantes (CIC), formados por antígenos do género *Leishmania*, imunoglobulinas das classes IgG ou IgM e fracções do complemento, principalmente C3 (Campillo *et al.*, 1999). Estes CIC normalmente são removidos de forma eficiente pelo sistema monocítico-macrofágico, mas na presença de uma quantidade excessiva a sua remoção não é eficaz. A acumulação dos CIC desencadeia uma reacção de hipersensibilidade tipo III, na qual ocorre a activação do complemento. Esta activação provoca a desgranulação de basófilos e plaquetas, com libertação de mediadores inflamatórios como a histamina, que causam, por sua vez, um aumento da permeabilidade vascular. A alteração na permeabilidade permite a deposição dos complexos imunes na parede dos vasos, induzindo a agregação plaquetária e a formação de coágulos sanguíneos (microtrombos) nessa parede. A activação do complemento desencadeia ainda a desgranulação dos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), causando lesões enzimáticas nas paredes vasculares e conseqüente vasculite (Prescott, Harley & Klein, 2005). Entre os locais onde foram demonstradas lesões por deposição de complexos imunes destacam-se os processos ciliares do olho (uveíte), as articulações (poliartrite) e a membrana basal glomerular do rim (glomerulonefrite). Por outro lado, na Leishmaniose foi também documentada a produção de auto-anticorpos contra as próprias plaquetas e eritrócitos, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de trombocitopenia e/ou anemia imunomediada nesses animais (Campillo *et al.*, 1999; Ferrer, 2002b).

Vários estudos têm permitido demonstrar que, além da resposta imunitária, outros factores de resistência são importantes no controlo da susceptibilidade à Leishmaniose canina, dos quais se destaca a predisposição genética. Deste modo, o mapeamento e sequenciação do gene canino *Slc11a1* (NRAMP1) revelaram que, nos animais susceptíveis, existia uma mutação de um nucleótido da região promotora desse gene. O gene *Slc11a1* codifica um anti-transportador bivalente catião-protão, importante na regulação da actividade leishmanicida dos macrófagos e no controlo da replicação do protozoário no fagossoma (Baneth, 2006; Bourdeau, 2009). Por outro lado, num estudo sobre a variação genética do MHC-II, denominado sistema do antigénio leucocitário canino (DLA), realizado num grupo de cães de uma área endémica no Brasil, foi detectada uma significativa correlação entre a presença do alelo DLA-DRB1\*01502 e a susceptibilidade à doença (Quinell *et al.*, 2003). Estudos epidemiológicos permitiram identificar que a raça Podengo Ibicenco, apesar de ser natural de uma região endémica de Leishmaniose, como são as Ilhas Baleares, raramente manifesta doença clínica, desenvolvendo uma resposta imunitária predominantemente celular (Baneth *et al.*, 2008). No entanto, as raças Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e Pastor Alemão têm sido consideradas mais susceptíveis à doença. Os estudos dos factores de risco associados à Leishmaniose canina permitiram revelar ainda a importância da idade dos animais, uma vez que a prevalência da doença é maior nos jovens com menos de três anos e nos mais velhos, com mais de 8 anos, não tendo sido identificada predisposição sexual, apesar de alguns autores referirem que os machos são mais afectados (Solano-Gallego & Baneth, 2008).

#### **4. QUADRO SINTOMATOLÓGICO E LESIONAL**

No passado, a classificação dos animais com Leishmaniose era feita apenas com base no exame físico, permitindo caracterizá-los como assintomáticos, na ausência de sintomatologia, oligossintomáticos, se estava presente um número reduzido de sinais clínicos, ou polissintomáticos, quando manifestavam um quadro clínico multiorgânico. Contudo, esta classificação era limitada, uma vez que não tinha em consideração as alterações laboratoriais, nem os cães com disfunção orgânica mas sem manifestação clínica aparente. Deste modo, recentemente, foi proposta a designação de “infecção subclínica”, nos cães infectados clinicamente saudáveis, isto é, com presença confirmada de *Leishmania* mas sem alterações no exame físico e nas análises laboratoriais elaboradas, e de “Leishmaniose clínica” nos animais com sinais clínicos e/ou alterações laboratoriais (Campillo *et al.*, 1999; Bourdeau, 2009).

As características clínicas da Leishmaniose canina variam amplamente como consequência dos numerosos mecanismos patogénicos do protozoário, da diversidade de respostas imunológicas desenvolvidas nos hospedeiros e dos diferentes órgãos afectados (Solano-Gallego & Baneth, 2008). Segundo o nível de afectação orgânica, a doença pode ser classificada como cutânea, visceral ou viscerocutânea, podendo também apresentar três quadros evolutivos: agudo, subagudo e crónico. As formas agudas e subagudas da doença são raras, comparativamente com a forma crónica, e implicam uma evolução que varia entre 3-4 semanas e 2-3 meses. Na Bacia Mediterrânica, as formas progressivas, de curso crónico e implicação viscerocutânea são a apresentação clínica mais frequente da Leishmaniose canina (Campillo *et al.*, 1999).

No cão, após infecção, decorre um período de incubação até ao aparecimento dos primeiros sintomas, que é considerado muito longo, podendo variar de 3 meses a 6 anos (Roze, 2005). A manifestação inicial mais comum é a alteração do estado geral do animal, com perda de peso progressiva, acompanhada de astenia, apatia e em alguns casos de anorexia e hipertermia (39°-40°C). Este quadro tem um início insidioso e um desenvolvimento progressivo, sendo designado de síndrome geral inespecífico (Campillo *et al.*, 1999).

O quadro histopatológico clássico na Leishmaniose canina é uma reacção inflamatória crónica intensa, do tipo granulomatosa, consequente da acção directa da *Leishmania* nos órgãos, nomeadamente, na pele, no fígado, no baço, nos linfonodos, nos rins, nos olhos, nos ossos e nos intestinos. Contudo, as lesões orgânicas também podem resultar da acção indirecta do parasita, através da deposição de complexos imunes nas articulações, nos vasos sanguíneos, nos olhos e nos rins (Bueno, 2006; Noli *et al.*, 2006).

#### **4.1. Lesões cutâneas**

As lesões dermatológicas são a manifestação clínica mais frequente da Leishmaniose canina, estando presentes em cerca de 81-89% dos cães sintomáticos, e podem ocorrer isoladamente ou em conjunto com outros sintomas e/ou alterações laboratoriais (Baneth *et al.*, 2008; Bourdeau, 2009). Entre a grande diversidade de alterações da pele destacam-se quatro padrões lesionais principais: a forma alopecica e descamativa, a forma ulcerativa, a forma nodular e a dermatite pustular. Contudo, em alguns animais pode estar presente mais do que um padrão lesional da pele (Noli *et al.*, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

A forma alopecica e descamativa (Figura 10), observada em 60% dos cães com alterações cutâneas, apresenta uma distribuição, geralmente simétrica, na cabeça, proeminências ósseas, extremidades dos membros e ponta da cauda, podendo culminar em alopecia generalizada. Na

cabeça, as lesões são principalmente na região periocular, conferindo um aspecto de “óculos”, no focinho e nos pavilhões auriculares. O pêlo apresenta-se baço e quebradiço e a descamação é seca, não pruriginosa. O corte histológico da pele das zonas de alopecia, das faces e das almofadinhas plantares, revela a presença de hiperqueratose e de dermatite difusa não supurativa, com infiltração de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos, alguns dos quais parasitados. De entre todos os cães afectados pela doença, os que apresentam esta forma cutânea são considerados os mais imunocompetentes, na medida em que foi identificado um número apropriado de células de Langerhans nessas lesões da pele (Noli *et al.*, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

A dermatose ulcerativa (23%) caracteriza-se pela presença de úlceras, sem tendência para a cicatrização, predominantemente, nas proeminências ósseas, extremidades dos membros e junções mucocutâneas (Figura 11). Nos cortes histológicos, observam-se úlceras limitadas por hiperplasia da epiderme, com um infiltrado celular misto (neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos) e alguns protozoários. Estes cães têm, provavelmente, uma imunocompetência intermédia (Noli *et al.*, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

**Figura 10** – Seborreia seca e alopecia peri-ocular, nos pavilhões auriculares e focinho



Fonte: [http://intranet.fmv.utl.pt/atlas/pele/pele\\_013.htm](http://intranet.fmv.utl.pt/atlas/pele/pele_013.htm)

**Figura 11** – Dermatose ulcerativa no membro posterior (fotografia original)



Na forma nodular (12%), surgem nódulos cutâneos, por vezes não ulcerados, de consistência variável, cujo diâmetro varia entre alguns milímetros e 10 cm. A sua distribuição pode ser generalizada, atingindo a zona torácica, lombar e as falanges (Figura 12). Histologicamente identificam-se fenómenos degenerativos, focos de necrose e infiltração acentuada de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e células gigantes multinucleadas, havendo ainda um grande número de parasitas. Nestes animais, estão completamente ausentes as células Langerhans da pele, podendo contribuir para uma resposta imunitária ineficaz (Noli *et al.*, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Os cães com dermatite pustular (4%) apresentam pústulas estéreis no tronco, abdómen, axilas e bragadas. A nível histológico são identificadas pústulas subcorneais com neutrófilos, dermatite ligeira não supurativa e poucos protozoários. A patogenia desta forma ainda é desconhecida (Noli *et al.*, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

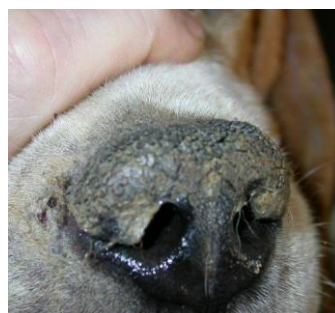
Por outro lado, outras lesões da pele e anexos associadas à Leishmaniose canina incluem a hiperqueratose e despigmentação do focinho (Figura 13) e o crescimento excessivo das unhas (onicogribose). Esta alteração, que ocorre em cerca de 20-31% dos cães sintomáticos, deve-se à presença de *Leishmania* na matriz ungueal e à hipersensibilidade das almofadinhas plantares, que dificulta o desgaste normal das unhas, havendo ainda inflamação da base ungueal e da pele adjacente (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Baneth *et al.*, 2008).

**Figura 12** – Nódulo cutâneo não ulcerado na região dorso-lombar



Fonte: [http://intranet.fmv.utl.pt/atlas/pele/pele\\_015.htm](http://intranet.fmv.utl.pt/atlas/pele/pele_015.htm)

**Figura 13** – Hiperqueratose nasal (fotografia original)



#### 4.2. Lesões oculares

As lesões oftalmológicas são frequentes na Leishmaniose canina (16-80%), podendo ocorrer isoladamente ou ser a principal manifestação clínica em 3,7 a 16% dos cães sintomáticos (Komnenou & Koutinas, 2007). Todos os tecidos do globo ocular podem ser afectados, de forma uni ou bilateral, sendo as lesões mais frequentes as conjuntivites, as queratites e as uveítes. No entanto, nas fases avançadas de doença ocular é comum surgirem complicações como a querato-conjuntivite seca (Figura 14), a atrofia da íris, o descolamento da retina, a úlcera, o glaucoma, a catarata e a exoftalmia. É de salientar ainda que, em cerca de 10% dos animais afectados, pode ocorrer perda de visão (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

A conjuntivite pode manifestar-se como simples hiperémia, quemose, inflamação bilateral purulenta ou mesmo com a formação de granulomas. Estes são raros, geralmente bilaterais, de dimensão e forma variadas, cor branca ou rosada, consistência mole e localizam-se no limbo esclero-corneano, estendendo-se por vezes às camadas superficiais da córnea. Esta conjuntivite granulomatosa representa uma reacção inflamatória consequente da precipitação de complexos imunes e da presença de *Leishmania* no local. Na membrana nictitante

observam-se os mesmos tipos de lesões da conjuntiva, incluindo granulomas no bordo livre, e hipertrofia glandular (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Os processos inflamatórios da córnea, apesar de poderem surgir de forma isolada, são mais frequentes em associação com uveítes ou com conjuntivites. As queratites superficiais podem estar associadas à formação de úlceras, neovascularização, edema e pigmentação, enquanto nas queratites intersticiais existe opacidade provocada por edema ou por um infiltrado celular inflamatório (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

A querato-conjuntivite seca é caracterizada por hiperémia, quemose, secreção purulenta, edema corneal e neovascularização. Actualmente, os mecanismos considerados responsáveis por esta alteração ocular são a destruição das glândulas lacrimais e obstrução das vias lacrimais, pela inflamação piogranulomatosa local, e a hipoestesia da córnea lesionada, que desencadeiam a redução da produção e secreção das lágrimas (Komnenou & Koutinas, 2007).

As uveítes anteriores são a manifestação ocular mais comum da Leishmaniose canina, apresentando edema da córnea e da úvea, formação de fibrina na câmara anterior, miose e múltiplos nódulos no estroma da íris. A uveíte posterior é diagnosticada com menor frequência, surgindo em associação com a uveíte anterior (Komnenou & Koutinas, 2007).

As pálpebras podem apresentar lesões granulomatosas, semelhantes às alterações conjuntivais, ou lesões idênticas às da pele, com formação de blefarite furfurácea e alopecia (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

**Figura 14** – Querato-conjuntivite seca com secreção mucopurulenta (fotografia original)



#### **4.3. Lesões musculares, articulares e ósseas**

As lesões do aparelho locomotor podem surgir em animais com bom estado geral, desencadeando o aparecimento de claudicações, o enfraquecimento dos membros e um quadro profundo de astenia e depressão (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

A nível muscular, surge uma atrofia generalizada, com caquexia e demarcação acentuada das proeminências ósseas (Figura 15). Esta atrofia inicia-se nos músculos da cabeça (temporais e masséteres) e, em conjunto com a alopecia, confere ao animal o aspecto de “cabeça de velha” ou *facies* senil (Figura 16). Este processo atrófico está associado a polimiosite crónica resultante da infiltração de células fagocitárias, da deposição de complexos imunes e da presença de auto-anticorpos contra as fibras musculares (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Baneth *et al.*, 2008).

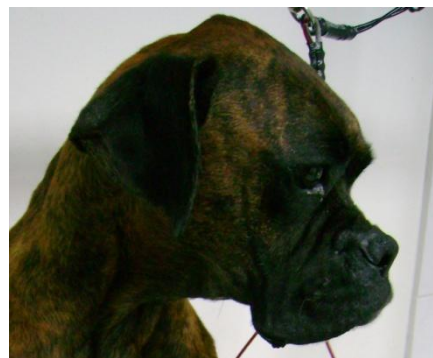
A nível ósseo podem observar-se lesões proliferativas periósticas e intramedulares, bem como osteólise cortical e medular (Baneth *et al.*, 2008).

É de salientar ainda a ocorrência de sinovites e poliartrites, com tumefacção das articulações, estando geralmente associadas à presença e deposição de complexos imunes no líquido e nas membranas sinoviais (reacção de hipersensibilidade tipo III) (Kohn, 2007).

**Figura 15** – Caquexia (fotografia original)



**Figura 16** – Atrofia dos músculos da cabeça (fotografia original)



#### 4.4. Lesões do aparelho digestivo

Na Leishmaniose canina foi descrito o aparecimento de gastrite e enterite, que podem ser consequência das alterações hepáticas e renais, típicas da doença, ou resultar da lesão directa do protozoário, uma vez que, em casos de enterite e colite granulomatosa, foi possível identificar o parasita após biópsia à mucosa intestinal. Estas lesões gastrointestinais podem ser acompanhadas por síndrome de má absorção, diarreia alternada com coprostase, hematoquésia, melena e/ou hematemesa, estando as três últimas presentes apenas quando existem lesões ulcerativas gástricas ou intestinais (Noli *et al.*, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008). Por outro lado, o tracto digestivo superior pode manifestar formas atípicas da doença, como nódulos na língua e gengivas (Roze, 2005).

#### **4.5. Lesões dos órgãos linfóides**

A linfadenomegália, localizada ou generalizada, é uma das manifestações clínicas mais consistentes na Leishmaniose canina, estando presente em 62-90% dos cães sintomáticos. Os principais linfonodos lesados são os sub-mandibulares, os cervicais, os pré-escapulares, os axilares e os poplíteos, apresentando hipertrofia e/ou aumento de consistência. Histologicamente, verifica-se uma depleção linfocitária e uma reacção proliferativa de plasmócitos e de macrófagos, cujo citoplasma se apresenta repleto de *Leishmania*. A carga parasitária dos linfonodos geralmente não está correlacionada com o tipo e gravidade das outras lesões orgânicas, sendo comum a regressão da adenopatia com a evolução da doença (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Baneth *et al.*, 2008).

A esplenomegália, detectada em 10 a 53% dos cães sintomáticos, está relacionada com a proliferação de monócitos e macrófagos e com modificações na estrutura esplénica, nomeadamente o desenvolvimento significativo das vénulas e veias pulpares, o desaparecimento da maioria dos sinusóides que envolvem a polpa branca e o aumento das fibras reticulares (Baneth *et al.*, 2008). Deste modo, na fase inicial da doença o baço encontra-se congestionado e hipertrofiado enquanto na fase crónica apresenta cápsula espessada, atrofia e aumento de consistência (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

As alterações da medula óssea incluem diminuição de consistência, depleção das séries eritoblástica, leucoblástica e megacarioblástica, aumento do número de plasmócitos e formação de granulomas ricos em macrófagos, granulócitos e linfócitos T (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

#### **4.6. Lesões hepáticas**

No fígado a lesão mais característica é a inflamação crónica proliferativa, que se inicia com alterações vasculares, processos degenerativos dos hepatócitos e infiltração celular, principalmente por linfócitos, plasmócitos e histiócitos, podendo ainda ocorrer hiperplasia, hipertrofia e mobilização das células de Kupffer. Este infiltrado celular, onde é possível identificar formas de *Leishmania*, pode apresentar-se de forma difusa ou sob a forma de microgranulomas, geralmente pouco organizados. Posteriormente, devido às alterações vasculares e aos processos degenerativos, iniciam-se fenómenos de necrose e formação de tecido fibroso, que em alguns casos culminam em cirrose (Campillo *et al.*, 1999; Alexandre-Pires & Correia, 2008). A hepatite crónica granulomatosa, presente em 5% dos casos, pode causar hepatomegália, vômito, poliúria/polidipsia (PU/PD), anorexia e perda de peso (Noli *et al.*, 2006).

#### **4.7. Lesões cardíacas e respiratórias**

As lesões cardíacas localizam-se no miocárdio, onde ocorre a formação de granulomas ricos em macrófagos, granulócitos e linfócitos T, que pode ser acompanhada por necrose e degenerescência das fibras miocárdicas (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Nos pulmões é possível identificar alterações vasculares e pneumonia de tipo exsudativo ou intersticial, com infiltração linfoplasmocitária e com presença de macrófagos parasitados, traduzindo-se clinicamente por dispneia e hemoptise (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

A nível das fossas nasais, se a mucosa apenas apresentar lesões ligeiras, o único sintoma observado são espirros persistentes. É importante salientar no entanto, a presença de epistáxis em 6 a 10% dos animais sintomáticos, onde esta pode ser a única manifestação clínica e a principal causa de morte, se a hemorragia for profusa e incontrolável. A epistáxis pode ser uni ou bilateral, eventualmente recidivante, sendo considerados como principais mecanismos responsáveis pela sua ocorrência a perturbação da coagulação, devido à trombocitopenia e à hiperglobulinemia, a presença de úlceras na mucosa nasal, consequentes de rinite piogranulomatosa ou linfoplasmocítica, e a vasculite por deposição de complexos imunes (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Baneth *et al.*, 2008).

#### **4.8. Lesões do aparelho reprodutor**

Está descrita a presença de lesões na maioria dos órgãos genitais masculinos em cães com Leishmaniose, destacando-se a orquite intersticial linfoplasmocítica com degenerescência testicular secundária, epididimite linfocitária e balanopostite histiocitária. Foram encontradas formas amastigotas, no interior dos macrófagos, no testículo, no epidídimo, na glândula peniana e no prepúcio. Apesar de ser uma manifestação clínica atípica, podem ser observados granulomas no pénis (Diniz *et al.*, 2005; Roze, 2005).

#### **4.9. Lesões do sistema nervoso**

Os sintomas neurológicos associados à Leishmaniose canina são inconstantes e transitórios, dos quais se destacam: a hipoestesia, a hiperestesia, por vezes com dores súbitas do terço posterior que são reveladas por claudicação, a paresia, que pode suceder no terço posterior, e a paralisia, por vezes de forma paraplégica ou afectando nervos periféricos, como o ciático (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

As lesões nervosas parecem ser discretas e estão associadas sobretudo à deposição de anticorpos anti-*Leishmania* no plexo coróide, que pode predispor para a degenerescência neuronal, mobilização de células da glia e acumulação de substância amilóide. Apesar de estar

descrita a presença desses anticorpos no humor aquoso e no líquido cefalorraquidiano, através da sua passagem pela barreira hematoencefálica, ainda não formam isoladas formas amastigotas no sistema nervoso central (Lima, Gonçalves, Ikeda, Luvizotto & Feitosa, 2003; Noli *et al.*, 2006).

#### **4.10. Consequências renais da Leishmaniose canina**

O envolvimento renal é frequente durante o curso da Leishmaniose canina. A doença renal pode ser a única manifestação clínica nos animais infectados, podendo progredir de proteinúria assintomática até síndrome nefrótica ou Insuficiência Renal Crônica, sendo esta responsável pela degradação do estado geral e a principal causa de morte nos cães com Leishmaniose (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Bourdeau, 2009). As alterações patológicas identificadas com maior frequência são a glomerulonefrite e a nefrite tubulo-intersticial, podendo, em raras ocasiões, ser detectada amiloidose (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

As primeiras alterações ocorrem nos túbulos renais e incluem processos de degenerescência hidrópica e hialina, atrofia ou dilatação tubular, presença de cilindros hialinos, calcificação e necrose, que se intensificam à medida que a doença progride (Campillo *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2008).

A nefrite intersticial, de tipo agudo ou crônico, é a lesão mais comum do interstício renal, onde pode estar presente edema, degenerescência tecidular, fibrose, infiltração linfoplasmocitária e alguns macrófagos contendo *Leishmania* (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Gomes *et al.*, 2008). O mecanismo responsável por estas alterações intersticiais não está completamente esclarecido, mas a identificação de depósitos de imunoglobulinas e fracções do complemento sugerem uma origem imunológica (Soares, Moraes & Moraes, 2009). Por outro lado, a interação dos antígenos de *Leishmania*, presentes no interstício renal, com os linfócitos T, foi descrita como o mecanismo básico das lesões tubulo-intersticiais, sendo mediada por macrófagos do infiltrado inflamatório e pelas células epiteliais tubulares, que apresentam actividade fagocitária e actuam como APC (Gomes, 2007). É de salientar ainda que a nefrite intersticial não parece ter relação ou influência no tipo de glomerulonefrite presente no animal doente (Gomes *et al.*, 2008).

Na Leishmaniose canina, a glomerulonefrite está frequentemente associada à deposição ou formação local de complexos imunes (Baneth *et al.*, 2008). Estudos imunohistoquímicos permitiram revelar também a presença de depósitos de imunoglobulinas, nomeadamente IgG e IgM e da fracção C3 do complemento, reforçando a importância das reacções imunitárias na patogenia das lesões glomerulares (Soares *et al.*, 2009). Contudo, outros elementos

imunológicos foram ainda implicados no desenvolvimento de glomerulonefrite, mais especificamente os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Costa *et al.*, 2000).

Após a formação e deposição dos complexos imunes nas paredes dos capilares glomerulares, ocorrem os processos responsáveis pelas lesões nos glomérulos, nomeadamente a activação do sistema complemento, a infiltração de polimorfonucleares neutrófilos, a agregação plaquetária e a activação da cascata de coagulação, com deposição de fibrina. A adesão e agregação plaquetária são estimuladas directamente pela presença de complexos imunes ou pela presença de lesões nas células endoteliais. Posteriormente, as plaquetas libertam mediadores inflamatórios e substâncias vasoactivas, como o tromboxano, e activam a cascata de coagulação, o que vai exacerbar as lesões glomerulares. Por outro lado, parece haver intervenção da angiotensina II, que provém da circulação sistémica ou é formada no rim por conversão da angiotensina I, contribuindo para a proliferação celular nos glomérulos e para o aumento da pressão intraglomerular, por vasoconstrição da arteríola eferente. A infiltração de neutrófilos, resultante da activação do complemento, conduz à libertação de enzimas proteolíticas e à produção de radicais livres de oxigénio, favorecendo assim o desenvolvimento da glomerulonefrite. Nos glomérulos pode ocorrer, como resposta a estes processos, proliferação celular, espessamento da membrana basal e, eventualmente, hialinização e esclerose (Nelson & Couto, 2003).

Em Medicina Veterinária, como em Medicina Humana, é possível classificar as doenças glomerulares através da histopatologia, da microscopia electrónica e da técnica de imunofluorescência. Deste modo, as lesões glomerulares identificadas com maior frequência, na Leishmaniose canina, são a glomerulonefrite membranoproliferativa e/ou mesangioproliferativa, tendo sido também descritas a glomerulonefrite de lesões mínimas, a glomerulonefrite membranosa, a glomerulonefrite crónica e a glomeruloesclerose segmentar focal (Costa *et al.*, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2009). A glomerulonefrite membranoproliferativa está frequentemente associada a IRC, enquanto nos casos em que não existem evidências clínicas e laboratoriais de doença renal é mais comum a identificação das glomerulonefrites mesangioproliferativa e de lesões mínimas (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Na **glomerulonefrite membranoproliferativa** existe hiper celularidade intraglomerular, consequente da proliferação das células mesangiais, endoteliais e inflamatórias, expansão da matriz mesangial e espessamento das paredes dos capilares glomerulares. De acordo com o local preferencial de deposição dos complexos imunes solúveis, esta glomerulonefrite pode ser classificada em tipo I (deposição subendotelial e mesangial), tipo II (deposição na lâmina densa da membrana basal glomerular) e tipo III (deposição subendotelial, mesangial e subepitelial), sendo os dois primeiros tipos os mais comuns (Aresu *et al.*, 2007).

A característica principal da **glomerulonefrite mesangioproliferativa** é a proliferação global e difusa de células mononucleares no mesângio, onde são identificados os complexos imunes, sendo acompanhada pela expansão da matriz mesangial. O espaço capsular apresenta-se quase completamente preenchido pelo glomérulo, sem haver, contudo, alteração da membrana basal glomerular e das paredes e lúmen dos capilares (Costa *et al.*, 2003).

As **lesões glomerulares mínimas** incluem o ligeiro aumento da celularidade mesangial e as alterações estruturais e degenerativas dos podócitos, isto é, das células da camada visceral da cápsula de Bowman (Costa *et al.*, 2003).

A **glomerulonefrite membranosa** caracteriza-se pelo espessamento progressivo da membrana basal glomerular, que é desencadeado pela deposição de complexos imunes na lâmina densa e/ou a nível subepitelial. A fixação desses complexos pode ocorrer devido à presença de locais aniónicos na membrana basal glomerular, capazes de fixar moléculas carregadas positivamente, como é o caso dos complexos imunes. Ocorre ainda acumulação de colagénio e glicoproteínas na membrana basal, em torno dos complexos aí presentes. No entanto, as arquitecturas glomerular e mesangial tendem a ficar preservadas (Soares, Moraes, Palmeira, Miyazato & Moraes, 2005; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Na **glomerulonefrite crónica** destaca-se a intensa proliferação da matriz mesangial e a obstrução do lúmen dos capilares (esclerose glomerular), conduzindo à transformação do glomérulo numa massa amorfa, atrófica, hipocelular ou mesmo acelular. Neste tipo de lesões glomerulares não foram identificados os antígenos de *Leishmania*, o que é justificado pelo facto de a glomerulonefrite crónica ser o resultado final das restantes glomerulonefrites, podendo ter ocorrido entretanto a eliminação dos antígenos (Costa *et al.*, 2003).

A **glomeruloesclerose segmentar focal** desenvolve-se predominantemente nos glomérulos justamedulares, próximo das áreas de colapso do lúmen capilar, sendo possível detectar proliferação de colagénio, alterações estruturais dos podócitos e, por vezes, hiper celularidade em torno das zonas de esclerose glomerular (Costa *et al.*, 2003).

A **amiloidose** está descrita apenas num número reduzido de canídeos com Leishmaniose, podendo ser, nesses casos, responsável pelo aparecimento de lesões glomerulares e, consequentemente, de IRC (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). A microscopia permite revelar a deposição nos glomérulos de substância amilóide, ou seja material amorfo, acelular, de aspecto vítreo, geralmente eosinofílico e que cora de rosa quando se utiliza a coloração de Vermelho do Congo (Reis, Silva, Rachid & Nogueira, 2001).

A Leishmaniose canina provoca lesões renais intersticiais e tubulares graves, específicas da doença e estreitamente relacionadas com a alteração da função renal, independentemente da presença de alterações glomerulares (Gomes *et al.*, 2008). Por outro lado, a presença de lesões irreversíveis no glomérulo, provocadas pela amiloidose ou pela glomerulonefrite, contribui para que o nefrónio deixe de estar funcional e seja substituído por tecido fibroso cicatricial. A diminuição do número de nefrónios funcionais conduz à redução da filtração glomerular e, conseqüentemente, à retenção de sódio e hipertensão sistémica. Os nefrónios viáveis tentam compensar este estado, com o aumento individual da taxa de filtração glomerular, mas esta hiperfiltração pode contribuir para o agravamento das lesões renais (Nelson & Couto, 2003).

Uma das primeiras conseqüências fisiopatológicas da glomerulonefrite é a perda urinária de proteínas plasmáticas, como a albumina, resultante das alterações na permeabilidade da membrana basal glomerular. Esta proteinúria promove a progressão das lesões glomerulares e tubulo-intersticiais e, se for persistente, pode desencadear o aparecimento de alterações clínicas compatíveis com síndrome nefrótica, como hipoalbuminémia, ascite, edema periférico e hipercolesterolémia (Figura 17). A ascite e o edema ocorrem como resultado da diminuição da pressão oncótica plasmática e do aumento da actividade da aldosterona, que causa retenção de sódio e conseqüentemente de água. A hipercolesterolémia surge devido ao aumento da síntese hepática de proteínas e lipoproteínas e à redução do seu catabolismo, permitindo a acumulação de colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade, incapazes de atravessar as paredes dos capilares glomerulares (Nelson & Couto, 2003).

Como complicações frequentes do síndrome nefrótico destacam-se a hipertensão sistémica e a hipercoagulabilidade. A hipertensão pode resultar de vários processos, alguns dos quais já referidos anteriormente, como a retenção de sódio, a activação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, as lesões nas arteríolas e nos capilares glomerulares e a redução da produção de substâncias vasodilatadoras no rim. A hipercoagulabilidade e o tromboembolismo são secundários a alterações do sistema de coagulação, nomeadamente trombocitose, hipersensibilidade plaquetária e perda de antitrombina III pela urina. O tromboembolismo parece ocorrer mais frequentemente no sistema arterial pulmonar, conduzindo a hipóxia e dispneia. No entanto, nos poucos casos descritos de Leishmaniose canina associada a síndrome nefrótica e tromboembolismo, os trombos estavam localizados na artéria aorta, na veia cava caudal e/ou nas veias femorais, conduzindo a perda de propriocepção nos membros posteriores, a paraparesia, a ausência de pulso femoral, entre outras complicações (Nelson & Couto, 2003; Félix *et al.*, 2008).

**Figura 17** – Ascite num cão com Leishmaniose e síndrome nefrótica  
(fotografia original)



O termo Insuficiência Renal Crônica é utilizado para definir a presença de lesão renal persistente pelo período mínimo de três meses, caracterizada pela perda progressiva, definitiva e irreversível da massa funcional e/ou estrutural de um ou ambos os rins, podendo ser observada uma redução da taxa de filtração glomerular de até 50% em relação ao seu valor normal (Waki, Martorelli, Mosko & Kogika, 2010). No entanto, a manifestação clínica desta insuficiência só é observada quando  $\frac{2}{3}$  ou  $\frac{3}{4}$  do tecido renal de ambos os órgãos estão comprometidos (Gomes *et al.*, 2008). O quadro sintomatológico associado a IRC é muito diversificado, podendo destacar-se a perda de peso associada a má condição corporal, letargia, anorexia, PU/PD, palidez das mucosas, desidratação, vômito, e mais raramente, estomatite urêmica, úlceras gastrointestinais, hematemese, melena, diarreia, hipertensão arterial, com repercussões oculares como descolamento da retina, e alterações neurológicas, como estupor e ataxia (Elliott & Lefebvre, 2008).

## 5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da Leishmaniose canina é um processo complexo devido à sintomatologia polimórfica e às lesões histopatológicas muito semelhantes a outras doenças infecciosas e auto-imunes, mas por outro lado, não existe um método de diagnóstico com 100% de sensibilidade e especificidade (Ferrer, 1999). Deste modo, o diagnóstico correcto desta doença requer, frequentemente, a associação da história pregressa, do exame físico, das análises sanguíneas (hemograma, perfil bioquímico, proteinograma, perfil de coagulação) e da urianálise, às técnicas de diagnóstico laboratoriais específicas para *Leishmania* (Solano-Gallego & Baneth, 2008).

## 5.1. Diagnóstico clínico

### 5.1.1. Anamnese e exame físico

Para uma melhor aproximação ao diagnóstico, é importante realizar uma **anamnese** minuciosa, onde deve ser verificada a possibilidade de exposição do cão ao insecto vector, averiguando, por exemplo, qual é o local de habitação do animal, o seu modo de vida, as suas deslocações até zonas endémicas de Leishmaniose canina, e qual a profilaxia praticada pelo proprietário (Roze, 2005; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Por outro lado, a realização do **exame físico** é fundamental, permitindo conhecer a sintomatologia presente no animal e verificar se é compatível com esta doença. No entanto, como foi referido anteriormente, o quadro sintomatológico e lesional da Leishmaniose canina é heterogéneo, muitos dos sinais clínicos são inespecíficos e um número significativo de animais infectados permanecem assintomáticos, sendo aconselhável a realização de exames complementares que permitam orientar o diagnóstico (González, 2007).

### 5.1.2. Alterações hematológicas, bioquímicas e urinárias

O quadro sintomatológico da Leishmaniose canina é acompanhado, frequentemente, por alterações hematológicas, bioquímicas e urinárias muito variáveis na sua apresentação e intensidade (Campillo *et al.*, 1999).

Uma das **alterações hematológicas** mais comum é a anemia não-regenerativa (normocítica e normocrómica), podendo estar presente, mais raramente, a anemia regenerativa hemolítica (macrocítica e hipocrómica), causada por mecanismos imunomediados. A anemia geralmente desenvolve-se como consequência da diminuição da eritropoiese, resultante da doença crónica ou da Insuficiência Renal Crónica, sendo agravada por hemorragia e destruição imunomediada dos eritrócitos (Baneth, 2006). Pode também existir leucocitose com neutrofilia, mas é frequente a detecção de leucopénia, com redução das populações de monócitos, de eosinófilos e sobretudo de linfócitos. Esta leucopénia resulta do sequestro de leucócitos em diversos tecidos e órgãos e da diminuição da hematopoiese devido a disfunção medular, por parasitismo intenso da medula óssea (Campillo *et al.*, 1999; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Nas infecções por *Leishmania* podem surgir sinais de diátese hemorrágica, por exemplo epistaxis, tendo sido descritas como possíveis causas as lesões ulcerativas nasais, a trombocitopénia, a diminuição da actividade dos factores de coagulação e a hiperglobulinémia, que interfere com a polimerização da fibrina e que, em associação com a

urémia, conduz à disfunção plaquetária. A trombocitopénia pode resultar da presença de CIC e auto-anticorpos, de sequestro esplénico ou da supressão medular (Baneth, 2006; Baneth *et al.*, 2008). Nesta doença pode ainda haver um prolongamento do tempo de trombina (TT) e do tempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), bem como um aumento dos produtos de degradação do fibrinogénio (FDP) (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Por outro lado, nos casos de Leishmaniose canina em que há desenvolvimento de síndrome nefrótica, a perda urinária de antitrombina III, pode conduzir a um estado hipercoagulável, com consequente trombose periférica. Nestes casos, o nível sérico de fibrinogénio está aumentado, há agregação plaquetária e a quantidade de antitrombina III no sangue está reduzida (Félix *et al.*, 2008).

A **alteração bioquímica** mais frequentemente relacionada com a Leishmaniose canina é a disproteinémia. A electroforese das proteínas séricas (proteinograma) revela uma hiperproteinémia (valores entre 8-12 g/dL) com hiperglobulinémia e hipoalbuminémia, resultando numa diminuição do rácio albumina/globulina, que passa a ser inferior a 0,5 (Campillo *et al.*, 1999; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A hipoalbuminémia resulta da nefropatia com perda proteica, das alterações hepáticas, da má nutrição e/ou dos mecanismos de equilíbrio osmótico plasmático (Noli *et al.*, 2006). É de salientar que o síndrome nefrótico é caracterizado, geralmente, pela presença concomitante de hipoalbuminémia, hipercolesterolemia e proteinúria intensa (Nelson & Couto, 2003). A hiperglobulinémia, por sua vez, é consequente do aumento das beta-globulinas e das gama-globulinas, tendo-se verificado que na fase inicial da doença ocorre, geralmente, um aumento das beta-1 e beta-2 globulinas, que é seguido posteriormente pela subida das beta-3 e gama-globulinas. As principais causas desta hipergamaglobulinémia parecem ser a estimulação policlonal dos linfócitos B, mediada pelos antígenos do protozoário, a produção de anticorpos não específicos e a presença de CIC. No entanto, apesar de esta hipergamaglobulinémia estar presente em 80% dos cães doentes, não é patognomónica desta doença (Noli *et al.*, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). É importante referir que o proteinograma, além de auxiliar no diagnóstico, é considerado um dos melhores meios de monitorização da evolução da doença e da resposta ao tratamento, permitindo detectar ainda as suas eventuais recidivas (Roze, 2005; Noli *et al.*, 2006).

Nos cães que apresentam lesões hepáticas crónicas pode-se verificar um aumento moderado das enzimas hepáticas, nomeadamente da aspartato aminotransferase (AST), da alanina aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina sérica (FAS), que tem tendência a normalizar após o tratamento (Baneth, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Na Leishmaniose canina, a perda progressiva de nefrônios e a redução da filtração glomerular, características da Insuficiência Renal Crônica, conduzem ao aumento das concentrações plasmáticas de diversas substâncias que normalmente sofrem excreção renal, nomeadamente amónia, aminoácidos, péptidos, fósforo (hiperfosfatémia), creatinina e ureia (azotémia), gastrina (hipergastrinémia), glucagina, hormona do crescimento, entre outros. As concentrações plasmáticas crescentes destas substâncias são responsáveis, pelo menos em parte, pelo conjunto de sinais clínicos denominado síndrome urémico (Nelson & Couto, 2003; Baneth, 2006). Neste síndrome podem ser encontradas alterações gastrointestinais, como anorexia, vômito, diarreia, ulceração gástrica e da mucosa oral, complicações neurológicas, como letargia, estupor, tremores, ataxia, e consequências cardiopulmonares, como cardiomiopatia urémica, pericardite, edema pulmonar e hipertensão sistémica. A hipertensão pode contribuir, por sua vez, para o agravamento das lesões renais, cardíacas e cerebrais, conduzindo ainda ao desenvolvimento de alterações oftalmológicas como hifema, descolamento e hemorragia da retina (Nelson & Couto, 2003; Elliott & Lefebvre, 2008).

Contudo, na IRC podem também estar afectadas as funções endócrinas e metabólicas do rim, bem como haver perturbação da sua capacidade de manutenção do equilíbrio ácido-base e hidro-electrolítico, estando muitas vezes presentes acidose metabólica, hiperfosfatémia e hipocalémia. A acidose metabólica causa desmineralização óssea progressiva, perda urinária de cálcio, hipocalcémia e aumento do catabolismo das proteínas musculares, exacerbando a azotémia. A hiperfosfatémia, por sua vez, pode contribuir para a redução dos níveis de calcitriol e para a hipocalcémia, conduzindo ao aumento da secreção da paratormona (PTH) e ao desenvolvimento de hiperparatiroidismo secundário renal, com osteodistrofia e calcificação dos tecidos moles. Estas alterações ósseas são porém mais comuns nos animais jovens e distinguem-se, por exemplo, pela presença de deformação da mandíbula sem ocorrer fractura (“mandíbula de borracha”). Por outro lado, a hipocalémia causa dor e fraqueza muscular generalizadas, perturba a síntese proteica e contribui para a poliúria, uma vez que diminui a capacidade de resposta renal à hormona antidiurética (ADH) (Nelson & Couto, 2003; Elliott & Lefebvre, 2008).

As **principais alterações urinárias** identificadas nos cães com Leishmaniose canina e IRC são poliúria, proteinúria e isostenúria ou presença de urina inapropriadamente diluída, podendo por vezes ocorrer visualização de cilindros hialinos ou finamente granulados, durante o exame ao sedimento urinário (Canine Leishmaniasis Working Group [CLWG], 2007; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

A densidade urinária específica é frequentemente determinada na prática clínica para avaliar a função renal através da capacidade de concentração da urina, utilizando preferencialmente para esse propósito um refractómetro. A sua medição permite detectar a presença de poliúria, uma vez que a densidade urinária está inversamente relacionada com o volume de urina produzido em 24 horas, podendo ainda auxiliar na avaliação da proteinúria e do estado de hidratação do animal. Num cão saudável e hidratado, os valores de densidade urinária específica são muito variáveis, estando geralmente compreendidos entre 1.015 e 1.045. Na doença renal, uma das consequências mais frequentes é a alteração da capacidade do rim para concentrar a urina, mesmo na presença de desidratação e/ou azotémia, conduzindo assim à produção de urina inapropriadamente diluída (valores inferiores a 1.030) ou a isostenúria (valores entre 1.008 e 1.012) (Brown, 2007; Watson & Lefebvre, 2010). Nestes animais ocorre normalmente polidipsia na tentativa de compensar a excessiva perda de fluidos proveniente da poliúria (Elliott & Lefebvre, 2008).

A proteinúria está presente em 71-85% dos cães com Leishmaniose canina (Baneth, 2006). É de salientar que muitas condições podem originar proteinúria, sem haver doença renal, sendo por isso fundamental excluir, em primeiro lugar, as suas causas pré-renais e pós-renais, como hemorragia ou inflamação do tracto urinário posterior. Por outro lado, a proteinúria de origem renal pode ser classificada como funcional, sendo ligeira e transitória, ou como patológica, geralmente persistente. A determinação da persistência da proteinúria requer a repetição da análise em diferentes momentos clínicos, com um intervalo mínimo de duas semanas, independentemente do método utilizado para a sua detecção. A presença de proteinúria persistente é considerada um sinal de doença renal, estando associada a sedimento urinário normal ou com cilindros hialinos na glomerulonefrite, e a glicosúria e/ou excreção anormal de electrólitos se houver lesões nos túbulos renais que comprometam a reabsorção tubular (Grauer, 2001; Lees & Metzger, 2005).

O teste *gold standard* para avaliar a proteinúria consiste na recolha de urina durante um período de 24 horas, medição rigorosa do seu volume e concentração proteica, e cálculo da quantidade de proteína perdida (em mg de proteína na urina/ Kg de peso) nesse período de tempo. Contudo, esta técnica é dispendiosa e não tem aplicabilidade na prática clínica, sendo utilizada apenas em investigação (Elliott & Brown, 2004). Como alternativa, estão disponíveis diversos métodos que permitem detectar a perda urinária de proteína, nos quais estão incluídos os testes semi-quantitativos, o rácio proteína/creatinina urinário (UPC) e a medição da concentração de albumina urinária (Lees & Metzger, 2005; Pressler, 2006).

Os dois testes semi-quantitativos mais utilizados na prática clínica são a tira reactiva urinária e o teste turbidimétrico do ácido sulfosalicílico (SSA). A tira reactiva urinária é um teste

colorimétrico, de fácil utilização e baixo custo, em que ocorre ligação do grupo amina das proteínas da urina ao indicador presente no papel de filtro, desencadeando uma alteração de cor. Esta alteração é avaliada por comparação com uma escala de cores padronizada, o que torna este método subjectivo. Os resultados positivos obtidos (“vestígios”, 1+, 2+, 3+, 4+) devem ser sempre interpretados tendo em conta a densidade urinária específica, na medida em que a presença de pequena quantidade de proteína numa urina diluída pode ser considerada significativa. É de salientar que ocorrem falsos positivos quando a urina se encontra alcalina ou extremamente concentrada. Os falsos negativos estão relacionados com a sensibilidade desta técnica, por um lado porque é mais sensível para a albumina que para as outras proteínas e por outro porque apenas detecta concentrações proteicas entre 30-1000 mg/dL, limitando a sua utilização quando os valores são inferiores a 30 mg/dL (Grauer, 2001; Pressler, 2006). O SSA é um teste simples, pouco dispendioso, mas mais específico e sensível que a tira reactiva urinária, permitindo confirmar os resultados positivos (ambas as técnicas positivas) e detectar os falsos positivos (tira positiva e SSA negativo). Esta técnica consiste na junção do sobrenadante da amostra urinária com igual volume de uma solução a 5% de ácido sulfosalicílico num tubo de ensaio, o que causa a precipitação das proteínas e conduz a turvação da solução. Esta turvação é normalmente proporcional à quantidade de proteínas existente na urina e é classificada, subjectivamente, por um observador através de padrões descritivos, numa escala de 0 a 4+. O seu limite inferior de detecção é 5 mg/dL, sendo sensível para a albumina, mas também para as globulinas e outras proteínas. Por outro lado, a interpretação deste teste também exige a consideração da densidade urinária específica e podem ocorrer falsos positivos quando certos compostos, como os meios de contraste radiográfico, estiverem presentes na urina. No entanto, os resultados positivos destes dois testes semi-quantitativos pressupõem a utilização posterior de métodos quantitativos que avaliem de forma mais precisa a gravidade da proteinúria (Lees, 2006; Pressler, 2006).

O rácio proteína/creatinina urinário permite quantificar a concentração das proteínas na urina, auxiliando na avaliação da gravidade das lesões renais, da progressão da doença e da resposta ao tratamento. Este rácio baseia-se no princípio de que os níveis urinários de creatinina e proteína são determinados pela filtração glomerular e por isso, um aumento do rácio UPC, na ausência de inflamação pós-glomerular, reflecte o aumento da filtração das proteínas e possivelmente a progressão da IRC (Grauer, 2001; Pressler, 2006). Nos cães, valores de rácio UPC iguais ou superiores a 0,5 indicam a presença de proteinúria persistente de origem renal, se forem obtidos por repetição da medição em três ou mais amostras, recolhidas no mínimo com duas semanas de intervalo, e não estiverem presentes quaisquer causas pré-renais e pós-renais de proteinúria (Lees, Brown, Elliott, Grauer & Vaden, 2004; Pressler, 2006). A

glomerulonefrite e amiloidose alteram a permeabilidade selectiva dos capilares glomerulares, resultando frequentemente em rácios UPC superiores a 3,0. É de salientar porém, que este rácio não pode ser utilizado para diferenciar proteinúria glomerular da proteinúria associada a inflamação ou hemorragia do tracto urinário posterior (Grauer, 2001).

Estudos recentes permitiram demonstrar que a concentração urinária de albumina num cão é normalmente inferior a 1 mg/dL. O termo microalbuminúria é utilizado quando existe um aumento da excreção urinária de albumina que, contudo, não é detectado pelos métodos convencionais, como a tira reactiva urinária, compreendendo assim as concentrações situadas entre 1-30 mg/dL (Lees & Metzger, 2005). Na tentativa de superar esta contrariedade, têm sido desenvolvidos métodos semi-quantitativos e quantitativos que permitem a detecção da microalbuminúria na prática clínica, recorrendo a anticorpos anti-albumina específicos para a espécie canina, e que apresentam elevada sensibilidade e especificidade. Os testes semi-quantitativos recorrem a uma diluição prévia da amostra de urina, até obter uma densidade específica padronizada (geralmente 1.010), sendo os seus resultados referidos como “negativo”, “positivo ligeiro”, “positivo moderado” e “positivo intenso”. Este último resultado indica a existência de albuminúria evidente, isto é concentrações superiores a 30 mg/dL, mas não permite definir qual a magnitude realmente presente. Por outro lado, os métodos quantitativos, como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), fornecem uma estimativa razoável da concentração urinária de albumina, independentemente de estar incluída nos valores de microalbuminúria ou de albuminúria (Lees, 2006; Pressler, 2006). É importante salientar que nas doenças onde existe proteinúria de origem renal, a microalbuminúria pode ser detectada antes de ocorrer aumento do rácio UPC, sendo por isso útil na detecção precoce da IRC (Pressler, 2006). Nos cães, a microalbuminúria é considerada evidência de proteinúria persistente de origem renal, quando é detectada em três ou mais amostras de urina, recolhidas com duas ou mais semanas de intervalo entre si, e não pode ser atribuída a causas pós-renais (Lees *et al.*, 2004). De facto, este parâmetro pode ser utilizado como indicador de hipertensão intraglomerular, de patologia na membrana basal glomerular e/ou de disfunção nos túbulos proximais do rim (Elliott & Brown, 2004).

A proteinúria pode resultar de glomerulonefrite ou amiloidose, que apenas são diferenciadas por biópsia renal e posterior análise histopatológica. Contudo, esta prática não é recomendada nos animais com IRC porque, além de ser invasiva, pode não fornecer informação adicional sobre o prognóstico ou a evolução da doença (Elliott & Brown, 2004). Por outro lado, a ultrassonografia é uma técnica não-invasiva, que pode detectar precocemente as alterações patológicas renais associadas à Leishmaniose canina. Deste modo, os rins podem estar diminuídos de tamanho, com contorno irregular, com perda da definição da junção cortico-

medular e com aumento da ecogenicidade cortical devido a inflamação. Estas evidências podem permitir o diagnóstico de IRC nos animais com Leishmaniose, em associação com as alterações físicas e laboratoriais presentes (Gama, Larangeira, Aguiar & Barrouin-Melo, 2009).

### 5.1.3. Estadiamento e sub-estadiamento da Insuficiência Renal Crónica canina

A IRC é uma doença de carácter progressivo, sendo importante a diferenciação entre os seus estadios de evolução, de modo a estabelecer a abordagem terapêutica adequada e realizar a correcta monitorização do animal. A Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS) propôs um sistema de classificação, para cães e gatos, composto por quatro estadios de evolução da IRC, estabelecidos principalmente de acordo com as concentrações séricas de creatinina (Tabela 4). Este parâmetro é um marcador da taxa de filtração glomerular, permitindo detectar a deterioração da função renal (Brown, 2005; Waki *et al.*, 2010). Os valores de creatinina plasmática devem ser obtidos no paciente estável, em jejum e hidratado, em dois ou três momentos clínicos diferentes, sendo importante excluir as causas pré-renais e pós-renais da azotémia, bem como ter em conta a condição corporal do animal, sobretudo a massa muscular, a fim de evitar a classificação errada (Waki *et al.*, 2010). É de salientar que os dois primeiros estadios reflectem o facto do aumento da concentração plasmática de creatinina apenas ser detectado quando já existe lesão renal extensa, podendo estes estadios abranger concentrações que estão dentro ou no limite máximo do intervalo de referência da maioria dos laboratórios. Este facto demonstra a necessidade de associar, ao nível sérico de creatinina, outras alterações detectadas no animal e que permitem suspeitar de IRC (Elliott & Watson, 2010).

**Tabela 4** – Estadiamento da Insuficiência Renal Crónica canina (Adaptado de IRIS, 2009a)

Estadio	Creatinina Plasmática (mg/dL)	Lesões Renais/Sintomatologia
I Não Azotémico	< 1,4	Incapacidade de concentração urinária; proteinúria persistente de origem renal; alterações renais no exame físico, nos exames imagiológicos e/ou na biópsia. Ausência de manifestações clínicas.
II Azotémia Renal Ligeira	1,4-2,0	Perda progressiva de tecido renal funcional. Ausência ou presença de sinais clínicos ligeiros, como PU/PD.
III Azotémia Renal Moderada	2,1-5,0	Declínio da taxa de filtração glomerular. Sinais clínicos sistémicos podem estar presentes.
IV Azotémia Renal Grave	> 5,0	Perda significativa das funções renais. Presença de sinais clínicos sistémicos relacionados com o síndrome urémico.

É provável que alguns animais com IRC passem por todas as quatro fases se a doença renal progredir, enquanto outros permanecem num dos estadios sem ocorrer progressão da doença. Os animais afectados podem ser apresentados na clínica em qualquer estadio da doença, dependendo da atenção do proprietário e se o animal é ou não alvo de um rastreio regular de saúde (Elliott & Watson, 2010).

Após a realização do estadiamento da IRC, a IRIS recomenda que, sempre que possível, estes animais sejam sub-estadiados de acordo com a quantidade de proteína excretada na urina e com a pressão arterial sistémica. A avaliação destes dois parâmetros é aconselhável, uma vez que podem ocorrer, separadamente ou em conjunto, em qualquer estadio de IRC e constituem factores de risco independentes de lesão renal progressiva, interferindo no prognóstico e requerendo intervenção terapêutica específica (Elliott & Watson, 2010; Waki *et al.*, 2010).

O sub-estadiamento com base na proteinúria (Tabela 5) é feito após exclusão das causas pré-renais e pós-renais de perda urinária de proteína, como inflamação ou hemorragia do tracto urinário posterior, sendo necessário confirmar a sua persistência, através da medição do rácio UPC em três ou mais amostras de urina, recolhidas com um intervalo mínimo de duas semanas (IRIS, 2009a).

**Tabela 5** – Sub-estadiamento da Insuficiência Renal Crónica canina com base no rácio UPC (Adaptado de IRIS, 2009a)

Sub-estadio	Valores do rácio UPC
Não proteinúrico (NP)	< 0,2
Proteinúrico no limite (PL)	0,2-0,5
Proteinúrico (P)	> 0,5

Os cães classificados como proteinúricos no limite (tradução do termo original inglês *borderline*) devem ser reavaliados após dois meses, para que seja feita a sua correcta classificação. Por outro lado, os animais não proteinúricos e com proteinúria no limite podem ser categorizados como “microalbuminúricos”, através dos testes semi-quantitativos de detecção da albumina na urina, sendo por isso recomendada a sua monitorização contínua (IRIS, 2009a). Para os animais proteinúricos ou proteinúricos no limite a importância do resultado depende do estadio da IRC em que se encontram. Deste modo, a presença de proteinúria é mais significativa no estadio III que no estadio I, pois a quantidade de proteína filtrada diminui com a redução do tecido renal funcional (Elliott & Watson, 2010). A

proteinúria pode diminuir à medida que se agrava a perda da função renal e, por isso, pode ser menos frequente em animais nos estadios mais avançados da doença (IRIS, 2009a).

A insuficiência renal afecta a regulação da pressão arterial sistémica, conduzindo a hipertensão, que pode ser prejudicial para os rins, mas também para outros órgãos, como o olho, o coração e o cérebro. Actualmente, existe uma maior disponibilidade de técnicas de medição indirecta da pressão arterial sistémica na prática clínica, tornando mais fácil a sua avaliação, apesar de ainda não haver uma abordagem padronizada (Elliott & Watson, 2010). Idealmente, os animais devem estar num ambiente calmo e as medições devem ser feitas em diferentes dias, durante as visitas do paciente à clínica, sendo contudo aceitável a sua realização na mesma visita, com no mínimo duas horas de intervalo entre as determinações. Os animais são sub-estadiados pela pressão arterial sistémica (Tabela 6) de acordo com o seu valor e com o risco de lesão multi-orgânica a ele associado (IRIS, 2009a).

**Tabela 6** – Sub-estadiamento da Insuficiência Renal Crónica canina com base na pressão arterial sistémica (Adaptado de IRIS, 2009a)

Sub-estadio	Pressão arterial sistólica (mmHg)	Pressão arterial diastólica (mmHg)
0 Risco Mínimo	< 150	< 95
1 Risco Ligeiro	150-159	95-99
2 Risco Moderado	160-179	100-119
3 Risco elevado	≥ 180	≥ 120

Nos animais em que não existe evidência clínica de lesão orgânica, o diagnóstico de hipertensão deve ser feito com base em várias medições, que permitam assim demonstrar a persistência da pressão arterial sistémica (Elliott & Brown, 2004; IRIS, 2009a). A persistência deve ser avaliada em dois meses nos pacientes com risco moderado ou em uma a duas semanas se existe risco elevado. Por outro lado, quando estão presentes complicações resultantes de lesão multi-orgânica, não existe necessidade de demonstrar a persistência da hipertensão, devendo o tratamento ser instituído rapidamente. Segundo a IRIS, quando não é realizada a medição da pressão arterial, considera-se que o paciente apresenta hipertensão e risco de lesão multi-orgânica não determinados (IRIS, 2009a; Elliott & Watson, 2010).

Os algoritmos propostos pela IRIS para a classificação da IRC canina encontram-se apresentados nos Anexos 1, 2 e 3.

## **5.2. Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico clínico de Leishmaniose canina pode tornar-se complicado nos casos esporádicos, nos animais com sintomatologia pouco comum ou nos que se encontram numa fase latente ou inicial da doença, permanecendo assintomáticos (Campillo *et al*, 1999). Deste modo, os métodos laboratoriais específicos, actualmente disponíveis, são essenciais para o diagnóstico definitivo da doença nos animais sintomáticos, mas também nos cães infectados e clinicamente saudáveis. Estas técnicas de diagnóstico encontram-se agrupadas em três categorias: métodos parasitológicos (detecção do parasita), métodos serológicos (detecção de anticorpos anti-*Leishmania*) e métodos moleculares (detecção e amplificação do ADN do protozoário). No entanto, é fundamental conhecer as bases e as limitações de cada uma das técnicas de diagnóstico, bem como saber interpretar apropriadamente os seus resultados (Ferrer, 1999; Solano-Gallego & Baneth, 2008).

### **5.2.1. Diagnóstico parasitológico**

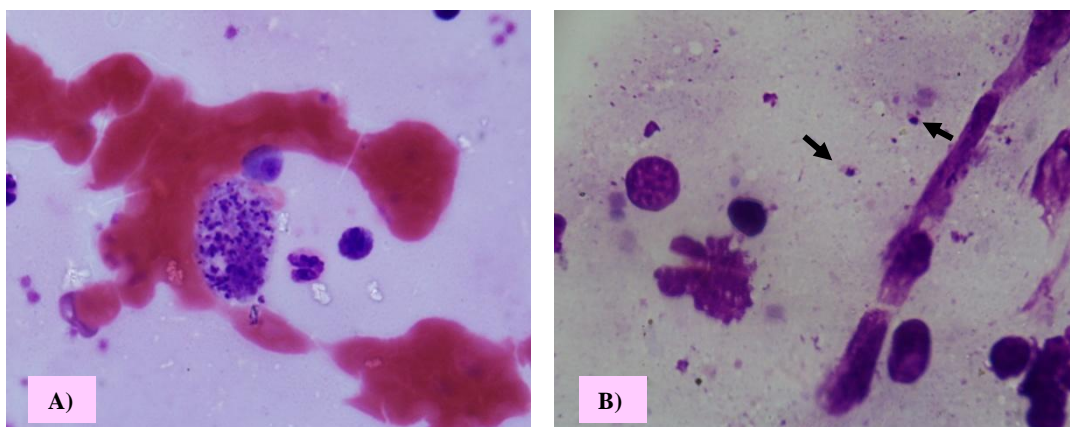
Os métodos parasitológicos têm como objectivo evidenciar a presença de *Leishmania*, a partir de amostras recolhidas no animal infectado. A sua especificidade é excelente (aproximadamente 100%) ao contrário da sua sensibilidade (valor máximo de 80% nos cães sintomáticos mas menor nos animais assintomáticos), sendo esta condicionada por factores como a amostragem, a fase de evolução da doença, a carga parasitária, entre outros. A presença do protozoário pode ser revelada através de métodos parasitológicos directos ou indirectos (Campillo *et al*, 1999; Baneth, 2006).

O exame parasitológico directo (Figura 18) pode ser feito em esfregaços obtidos do produto da punção aspirativa de linfonodos, da medula óssea e/ou de nódulos cutâneos, do produto de raspagem de lesões dermatológicas e também do líquido sinovial (se existir poliartrite), após coloração com o corante de Giemsa ou outro (CLWG, 2007; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A punção medular pode ser feita no fémur, na crista ilíaca ou na junção costochondral, enquanto a punção ganglionar é realizada sobretudo nos linfonodos poplíteos ou pré-escapulares (Campillo *et al*, 1999). Actualmente, os esfregaços obtidos de matriz ungueal, de baço e de fígado não são utilizados, uma vez que exigem técnicas demasiado traumáticas, com algum risco de hemorragia interna (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Este método permite a visualização das formas amastigotas do protozoário, no interior dos

macrófagos ou a nível extracelular após ruptura das células parasitadas, mas também possibilita a identificação de alterações citológicas consistentes com a Leishmaniose (CLWG, 2007). A citologia constitui um método de diagnóstico definitivo, de fácil realização, mas está dependente da experiência do observador, a sua sensibilidade é fraca (cerca de 50% para a medula óssea e 30% para o linfonodo) e tem o inconveniente de, por vezes, não permitir detectar o protozoário nos cães que estão nas fases iniciais de Leishmaniose ou sob tratamento (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

O protozoário pode ser observado também no exame histológico de biópsias da pele e de outros órgãos lesionados, onde se utiliza, geralmente, a coloração com Hematoxilina-Eosina ou com Giemsa. Para além do parasita, podem ser identificadas alterações histopatológicas consistentes com a doença, como a hiperplasia linfóide, a inflamação granulomatosa, piogranulomatosa ou linfoplasmocítica, entre outras. Contudo, a detecção das formas amastigotas pode ser difícil, sendo apropriada a utilização de técnicas imunohistoquímicas, como a da imunoperoxidase, que permitam aumentar a sensibilidade deste método e que confirmem a presença do parasita (Noli *et al.*, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

**Figura 18** – Diagnóstico parasitológico directo por citologia (fotografia original)



Legenda: **A)** Formas amastigotas de *Leishmania* spp., a nível intracelular, num esfregaço obtido após punção medular. Coloração Giemsa, ampliação 100x. **B)** Esfregaço do produto de raspagem de lesão cutânea sugere a presença do protozoário (setas). Coloração Giemsa, ampliação 100x.

Os métodos parasitológicos indirectos incluem o isolamento de *Leishmania* em meios de cultura, a inoculação em animais de experimentação e o xenodiagnóstico.

O exame parasitológico cultural é realizado através da inoculação do material obtido pela punção aspirativa do linfonodo ou da medula óssea, em meios de cultura líquidos suplementados com soro fetal bovino (FCS) ou em meio Novy, Nicolle e McNeal (NNN).

Nestes meios o parasita multiplica-se até serem detectáveis, por observação microscópica, as formas promastigotas. No entanto, esta técnica exige um longo período de incubação (6 a 15 dias à temperatura óptima de 22-25°C), uma observação periódica e não fornece um resultado positivo se a carga parasitária for reduzida, o que torna a sua utilização restrita à identificação de infecções patentes ou à caracterização da estirpe de *Leishmania* isolada (Campillo *et al*, 1999; Noli *et al.*, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Por outro lado, a cultura *in vivo* do protozoário pode ser realizada por inoculação de tecidos infectados, provenientes do cão suspeito em estudo, em animais de laboratório susceptíveis, como os *hamsters* (*Mesocricetus auratus*). A amostra é inoculada por via intraperitoneal e o parasita multiplica-se de tal forma que ao fim de 3-4 semanas é possível identificar amastigotas nos macrófagos peritoneais, bem como sinais clínicos característicos da doença. É de salientar que esta técnica apenas é utilizada em investigação (Campillo *et al*, 1999; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

O xenodiagnóstico é uma técnica que permite a detecção e isolamento do agente patogénico através do vector natural. Neste caso, consiste na exposição do cão suspeito, previamente sedado, com flebótomos criados em laboratório, que serão posteriormente examinados com o objectivo de detectar as formas promastigotas no seu tracto digestivo. Contudo, este método tem pouca aplicabilidade na prática clínica, apesar de parecer importante na resolução de questões epidemiológicas sobre o estado clínico e o tratamento da doença (Gradoni, 2002; CLWG, 2007).

### **5.2.2. Diagnóstico seroimunológico**

Os métodos serológicos são frequentemente utilizados em estudos de seroprevalência e na determinação de possíveis focos endémicos de Leishmaniose canina, mas a sua utilização na prática clínica tem sido crescente (Campillo *et al*, 1999).

Estas técnicas indirectas de diagnóstico baseiam-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes (principalmente IgG, em particular IgG1), uma vez que se pode desenvolver uma resposta imunitária humoral nos animais infectados (Ferrer, 1999). Também tem sido descrita a identificação de anticorpos, por métodos serológicos, no humor aquoso, no líquido cefalorraquidiano e na urina de cães com Leishmaniose canina. Verificou-se que as imunoglobulinas estavam presentes na urina dos animais que tinham rácio UPC superior a 1,0 e sedimento normal, tendo sido sugerida como consequência da alteração da permeabilidade selectiva da membrana glomerular, que ocorre durante o curso da doença. Esta descoberta é importante porque a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* na urina é um método mais

específico que o rácio UPC, podendo vir a representar um modo não-invasivo de diagnóstico e prognóstico de Leishmaniose nos cães com glomerulonefrite (Solano-Gallego *et al*, 2003). Apesar de as técnicas serológicas terem elevada sensibilidade e especificidade (80-100%), apresentam uma forte limitação no que diz respeito à impossibilidade de diagnosticar a doença quando não há produção de anticorpos, como ocorre durante o período de seroconversão (1,5 a 3 meses após infecção) ou nos animais considerados resistentes e que são assintomáticos. Estes animais, devido ao tipo de resposta imunitária celular que desenvolvem, são seronegativos ou apresentam títulos de anticorpos baixos (Campillo *et al*, 1999; Noli *et al.*, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Deste modo, a serologia pode subestimar a verdadeira prevalência da infecção assintomática na população canina, em zonas endémicas (Baneth, 2006). Idealmente, sempre que existam resultados serológicos inconclusivos, como titulações positivas baixas ou muito perto do limiar de positividade, deve proceder-se à repetição da prova, 30 dias depois da primeira, com o objectivo de verificar se se tratava de um título residual que foi decrescendo ou de uma infecção activa em progresso, ou então recorrer a outros métodos de diagnóstico (Baneth, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Por outro lado, é importante ter em conta que um resultado serológico positivo ou duvidoso num animal sem sintomas pode significar apenas o contacto com o protozoário, isto é, apesar de ter ocorrido infecção por *Leishmania*, o animal pode nunca vir a manifestar a doença, permanecendo porém como portador. Contudo, a maioria dos cães (50-60%) com títulos de anticorpos elevados apresentam sintomatologia característica da Leishmaniose ou irão desenvolver a doença ao fim de algum tempo, havendo poucos casos (menos de 5%) de animais doentes seronegativos. É de salientar o facto de um animal poder passar de resistente à infecção por *Leishmania*, a sensível e vice-versa, devido a tratamentos farmacológicos, infecções, imunossupressão, neoplasias, entre outros (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Têm sido também descritos falsos positivos devido à ocorrência de reactividade cruzada serológica com outros agentes patogénicos dos canídeos, como *Trypanosoma cruzi* (Norte e Sul da América), *Babesia*, *Ehrlichia* e *Neospora* (Maia, 2005; Baneth, 2006).

Os métodos serológicos não são suficientes para a avaliação da cura e monitorização da resposta ao tratamento, na medida em que a diminuição dos títulos de anticorpos pode suceder devido à redução da carga parasitária e não é necessariamente indicativa de cura parasitológica, ocorrendo frequentemente recidivas da doença (Ferrer, 1999; Baneth, 2006).

Diversos métodos serológicos têm sido desenvolvidos, incluindo a imunofluorescência indirecta (IFI), a aglutinação directa (DAT), a hemaglutinação indirecta (HI), a contraimuno-electroforese (CIE), a imunocromatografia rápida, os testes de fixação do

complemento, vários tipos de ensaios imunoenzimáticos (ELISA, ELISA de competição, Dot-ELISA, slide-ELISA) e o Western Blot (WB). Todas estas técnicas diferem em dois aspectos: o tipo de antigénio de *Leishmania* e o sistema de detecção e amplificação da presença de anticorpos anti-*Leishmania* utilizados. Em geral, as técnicas que utilizam o protozoário completo como antigénio (IFI, DAT, Dot-ELISA) são mais específicas e reprodutíveis que as que utilizam antigénios solúveis (testes de fixação do complemento). Actualmente, os métodos serológicos considerados satisfatórios são: IFI, ELISA, DAT e WB (Ferrer, 1999; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

A **imunofluorescência indirecta** é a técnica de diagnóstico da Leishmaniose canina mais antiga e a mais amplamente utilizada na actualidade. Apresenta elevada sensibilidade (90-100%) e especificidade (80-100%), sendo considerada o método serológico de referência pela OIE (*Office International des Epizooties*). Esta técnica consiste na incubação de diluições seriadas do soro em estudo com promastigotas de *Leishmania*, seguida da utilização de anti-anticorpos marcados com fluoresceína. Quando existem anticorpos anti-*Leishmania*, estes ligam-se ao antigénio e, por microscopia, torna-se visível uma fluorescência verde (CLWG, 2007; Romero-Peñuela & Sánchez-Valencia, 2007).

Como vantagens da IFI destaca-se a facilidade de execução, rapidez na emissão de resultados e baixo custo. Contudo, é importante conhecer o título a partir do qual o soro é considerado positivo (limiar de positividade ou “cut-off”), visto que este parâmetro varia muito consoante os laboratórios. A maioria dos laboratórios considera o resultado negativo se os cães apresentam títulos menores que 1:40, e positivo se os títulos forem iguais ou superiores a 1:80, sendo suspeitos de doença os animais que tenham títulos entre 1:40 e 1:80. Por outro lado, é adequado considerar como título de anticorpos elevado, apenas aquele que for o quádruplo ou mais do limiar de positividade do laboratório de referência, por exemplo para um “cut-off” de 1:80 os títulos considerados elevados são os superiores a 1:640 (CLWG, 2007). As limitações desta técnica estão associadas por um lado com a identificação de elevado número de falsos positivos (por exemplo por reactividade cruzada), por outro com o facto de apenas ser positiva se houver concentração suficiente de anticorpos circulantes, o que significa que um animal seronegativo pode estar infectado. Deste modo, é fundamental interpretar os resultados serológicos obtidos em conjunto com o quadro clínico do animal e, se necessário, confirmá-los com outro método convencional, a fim de assegurar o verdadeiro diagnóstico da doença (Romero-Peñuela & Sánchez-Valencia, 2007; Pereira da Fonseca & Villa de Brito). Apesar de no mercado estarem disponíveis *kits* de IFI, esta técnica é realizada,

normalmente, em laboratório visto que exige experiência e o recurso a microscópio de fluorescência (Gradoni, 2002; González, 2007).

O método de **ELISA** (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é indicado para avaliar um grande número de amostras, apresentando especial interesse nos inquéritos epidemiológicos. Esta técnica baseia-se na ligação do antígeno solúvel, adsorvido à placa, aos anticorpos presentes no soro do cão, permitindo a leitura do resultado através da aplicação do conjugado associado a uma enzima (peroxidase ou fosfatase) e a um substrato apropriado para esse tipo de enzima (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Nos casos positivos, ocorre uma reacção colorimétrica que pode ser quantificada por espectrofotometria, de forma a evitar a avaliação subjectiva do observador (CLWG, 2007). Apresenta uma sensibilidade entre 85-96% e uma especificidade entre 86-98%, estando estas variações relacionadas com a preparação dos antígenos completos usados ou com a utilização de antígenos purificados e/ou recombinantes. De facto, a utilização de antígenos recombinantes ou purificados, como as glicoproteínas de membrana (Gp63, Gp72 ou rK39) específicas do género *Leishmania*, melhoram a sensibilidade e especificidade deste método (Romero-Peñuela & Sánchez-Valencia, 2007). A técnica de ELISA tem como inconvenientes a detecção de falsos positivos e o facto de ser menos sensível para os cães que se encontram no período de latência da doença, sendo fundamental ter conhecimento do limiar de positividade e interpretar os resultados em conjunto com o quadro clínico, como sucede na IFI (Romero-Peñuela & Sánchez-Valencia, 2007; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). É de salientar que foram desenvolvidas diferentes variantes do método básico de ELISA, como ELISA de competição, Dot-ELISA, slide-ELISA, entre outras, permitindo assim aumentar a aplicabilidade desta técnica (Campillo *et al.*, 1999). Actualmente, existem diversos testes rápidos, baseados na técnica de ELISA, disponíveis no mercado e destinados à utilização na prática clínica, permitindo ao Médico Veterinário avançar para a realização de exames mais específicos e minuciosos que confirmem ou excluam o diagnóstico de Leishmaniose canina (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A **imunocromatografia rápida** é uma técnica qualitativa, de fácil execução, com obtenção do resultado num curto espaço de tempo (cerca de 10 minutos). Contudo, a sua eficiência no diagnóstico de Leishmaniose canina é menor que nos métodos IFI e ELISA, apresentando uma especificidade entre 61-100% e sensibilidade baixa, entre 30-70%. Presentemente, estão disponíveis *kits* comerciais que se baseiam nesta técnica e que são constituídos por tiras de papel de nitrocelulose impregnadas com antígenos recombinantes, como a proteína rK39, e

com anti-anticorpos marcados com ouro coloidal. Os anticorpos anti-*Leishmania* específicos, presentes no soro, plasma ou sangue total aplicado no teste, são detectados e o resultado positivo é representado por duas linhas (controlo e amostra). Num resultado negativo não aparece a linha correspondente à amostra e se não houver a linha do controlo o teste é considerado inválido (Otranto *et al.*, 2005; CLWG, 2007).

Na técnica de **aglutinação directa** é utilizada uma solução diluente que facilita a incubação do soro em estudo com o antigénio figurado, sendo feita a leitura visual do resultado alguns minutos depois. Apresenta elevada sensibilidade e especificidade, baixo custo, execução simples, sem necessitar de equipamentos específicos, permitindo detectar níveis baixos de anticorpos, durante a fase inicial da infecção ou nos casos assintomáticos de Leishmaniose canina. Actualmente, também se encontram disponíveis no mercado testes rápidos baseados na DAT (Campillo *et al.*, 1999; González, 2007; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

O **Western Blot** permite não só detectar os anticorpos anti-*Leishmania*, como também determinar a sua especificidade frente a diferentes fracções antigénicas do protozoário. Trata-se de uma técnica muito sensível e específica, útil para a detecção das fases iniciais da infecção e dos portadores assintomáticos, isto é quando a produção de anticorpos é mais reduzida, permitindo ainda identificar as reacções cruzadas que possam ocorrer com outras infecções. Deste modo, tem sido proposta a sua utilização nos cães de zonas endémicas, quando os títulos obtidos por IFI e ELISA se encontram próximos do limiar de positividade. Contudo, este método é complexo, dispendioso, requer experiência, e está limitado a investigações laboratoriais, não sendo realizado como rotina no diagnóstico (Campillo *et al.*, 1999; González, 2007).

É importante referir que existem **métodos de avaliação da resposta imunitária celular**, que são utilizados nos animais com manifestações clínicas sugestivas de Leishmaniose ou no estudo de casos em que há resistência à doença, destacando-se a Reacção de Montenegro e a Citometria de Fluxo (CLWG, 2007).

A Reacção de Montenegro é útil para o diagnóstico clínico, mas sobretudo para estudos epidemiológicos, contribuindo para determinar a exposição do animal ao parasita e para avaliar a evolução da doença durante o tratamento. Consiste na inoculação intradérmica do antigénio de *Leishmania* (leishmanina) e, 72 horas depois, na medição do diâmetro do eritema e induração formados. Os resultados negativos indicam ausência de contacto com o protozoário ou imunossupressão como ocorre nos cães sintomáticos. Os animais infectados

assintomáticos apresentam normalmente uma forte reacção à leishmanina inoculada (González, 2007; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

A Citometria de Fluxo permite a contagem de diferentes subpopulações de linfócitos, nomeadamente CD3<sup>+</sup> ou CD5<sup>+</sup> (linfócitos T), CD21<sup>+</sup> (linfócitos B), CD4<sup>+</sup> (linfócitos T *helper*) e CD8<sup>+</sup> (linfócitos T citotóxicos), bem como possibilita a determinação do rácio dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, no sangue periférico. Pode auxiliar no diagnóstico de Leishmaniose, na medida em que é frequente ocorrer uma redução do número de linfócitos B, das células T CD4<sup>+</sup> e do rácio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, nos animais com manifestação clínica da doença. Por outro lado, durante o tratamento e à medida que os sinais clínicos regridem, está descrito o aumento do número e percentagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, sugerindo assim que estes parâmetros podem ser bons indicadores do prognóstico. Contudo, este método ainda só é utilizado na investigação científica, não estando disponível para a prática clínica (Ferrer, 2002a; CLWG, 2007).

### 5.2.3. Diagnóstico molecular

Nos últimos anos, têm sido aplicadas várias técnicas de biologia molecular no diagnóstico de Leishmaniose canina, na tentativa de superar as limitações dos métodos seroimunológicos (Campillo *et al*, 1999).

A Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) é a técnica molecular mais utilizada e permite amplificar quantidades mínimas do ADN de *Leishmania*, através da utilização de sequências iniciadoras específicas (*primers*) (Maia, 2005; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A detecção do genoma parasitário é possível em amostras de uma grande variedade de tecidos do indivíduo infectado, como a medula óssea, os linfonodos, o fígado, o baço, a pele e a conjuntiva, mas também no sangue e urina. O diagnóstico de Leishmaniose canina por PCR apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade, sendo superiores nas amostras medulares, ganglionares e cutâneas, enquanto o sangue e urina são as amostras menos sensíveis (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Actualmente, vários centros de investigação estão a desenvolver *primers* que permitam aumentar a sensibilidade da técnica, de modo a que o sangue periférico possa vir a ser utilizado como rotina no método de PCR (Maia, 2005).

Apesar de esta técnica não reflectir a gravidade da infecção nem o estadio da doença, é muito útil no diagnóstico dos casos duvidosos e na detecção da persistência da infecção, nos animais em tratamento e clinicamente curados. No entanto, nos cães com reduzida carga parasitária após terapêutica ou nos portadores crónicos, as técnicas de PCR qualitativas (não quantitativas) têm pouco valor diagnóstico, visto que apenas indicam se os animais são ou não

positivos. Deste modo, actualmente, utilizam-se métodos de PCR quantitativos, como o PCR em tempo real (RT-PCR), que permitem quantificar as cópias de ADN presentes na amostra biológica e assim avaliar as variações da carga parasitária e monitorizar a resposta ao tratamento (CLWG, 2007; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). De facto, estudos recentes demonstraram que através do método convencional de PCR (qualitativo) só ocorre detecção do ADN do protozoário quando existem mais de 30 parasitas/mL, em amostras recolhidas de medula óssea, enquanto através do método RT-PCR (quantitativo) apenas 1 parasita/mL é necessário para demonstrar resultados positivos (Miró, Cardoso, Pennisi, Oliva & Baneth, 2008).

Como principais desvantagens das técnicas moleculares destaca-se o custo, na medida em que são executadas em laboratórios especializados, e o facto de detectarem o ADN parasitário independentemente de se tratar de protozoários viáveis ou não (Maia, 2005).

É importante salientar ainda que a informação obtida com o PCR deve ser relacionada com os exames físicos, laboratoriais e serológicos realizados, não sendo recomendado o início do tratamento num animal clinicamente saudável e que apenas apresente resultado positivo no PCR (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Um dos principais problemas que se coloca é a identificação dos melhores métodos laboratoriais para o diagnóstico da Leishmaniose canina, tendo em conta a sua complexidade e a ausência de um método infalível. Deste modo, os resultados laboratoriais de cada técnica têm de ser interpretados adequadamente, considerando que o diagnóstico desta doença é fundamentalmente clínico, visto que nenhum teste é, por si só, conclusivo sem se ter efectuado a observação do animal. Sempre que haja suspeita de Leishmaniose canina, em qualquer uma das suas formas, deve-se pesquisar directamente o parasita ou recorrer a métodos serológicos, idealmente associados à visualização de *Leishmania*, ou, mais recentemente, utilizando a técnica de PCR (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). No Anexo 4 está apresentado um algoritmo da abordagem diagnóstica nos cães com sintomatologia e/ou alterações laboratoriais compatíveis com Leishmaniose.

### **5.3. Estadiamento da Leishmaniose canina**

O grupo LeishVet propôs um sistema de estadiamento clínico para a Leishmaniose canina com o intuito de decidir a terapêutica mais adequada a cada paciente e inferir sobre o prognóstico. Este estadiamento da doença é feito com base nos sinais clínicos, nas alterações laboratoriais e nos resultados serológicos do animal, num dado momento clínico, geralmente

após confirmação do diagnóstico. O estadiamento determinado pode sempre ser alterado durante a monitorização do paciente, de acordo com a deterioração ou melhoramento do seu estado clínico (Miró *et al.*, 2010). Os quatro estadios clínicos da Leishmaniose canina, propostos pelo grupo Leishvet, encontram-se representados na Tabela 7.

**Tabela 7** – Estadiamento clínico da Leishmaniose canina (Adaptado de Miró *et al.*, 2010)

Estadio	Sintomatologia	Alterações laboratoriais	Serologia
I Doença ligeira	Sinais clínicos ligeiros: linfadenopatia periférica, dermatite papular	Sem alterações: creatinina < 1,4 mg/dL e UPC < 0,5	Negativo ou positivo baixo
II Doença moderada	Sinais clínicos do estadio I + dermatite descamativa, onicogrifose, úlceras, anorexia, perda de peso, febre, epistáxis	Anemia não-regenerativa ligeira, hiperglobulinémia, hipoalbuminémia. <u>Sub-estadio IIa:</u> creatinina <1,4 mg/dL e UPC < 0,5 <u>Sub-estadio IIb:</u> creatinina < 1,4 mg/dL e UPC 0,5-1,0	Positivo baixo a elevado
III Doença grave	Sinais clínicos do estadio II + vasculite, artrite, uveíte, glomerulonefrite	Alterações do estadio II + IRC no estadio I, UPC > 1,0 ou IRC no estadio II, creatinina 1,4-2,0 mg/dL	Positivo médio a elevado
IV Doença muito grave	Sinais clínicos do estadio III + tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica ou fase final de IRC	Alterações do estadio II + IRC no estadio III, creatinina 2,1-5,0 mg/dL ou IRC no estadio IV, creatinina > 5,0 mg/dL. Síndrome nefrótica com UPC > 5,0	Positivo médio a elevado

## 6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E DOENÇAS CONCOMITANTES

Devido ao quadro clínico variado e inespecífico da Leishmaniose canina, é necessário fazer o diagnóstico diferencial com outras doenças infecciosas e imunomediadas (Romero-Peñuela & Sánchez-Valencia, 2007). É importante referir que cada uma dessas doenças apresenta características clínicas e laboratoriais específicas, que devem ser tidas em conta durante a avaliação de cada paciente, para que o diagnóstico de Leishmaniose seja correcto. Contudo, este diagnóstico diferencial é muito extenso, pelo que apenas serão referidas, sucintamente, as principais doenças que se podem confundir com a Leishmaniose canina.

A dermatite alopecica e descamativa, se não estiver associada a sinais clínicos sistémicos, pode ser atribuída a Demodexose, adenite sebácea, alterações na queratinização e piodermite bacteriana. Por outro lado, as lesões ulcerativas cutâneas têm que ser diferenciadas de outras

doenças onde ocorre vasculite, como o Lúpus Eritematoso Sistémico, de tumores da pele e de infecção fúngica profunda. Os nódulos cutâneos podem ser resultantes de tumores da pele, granulomas estéreis ou infectados e dermatofibrose nodular. A presença de pústulas pode dever-se a Piodermite, Pênfigo Foliáceo, Demodecose, Sarna Sarcóptica, Atopia, Dermatite Alérgica à Picada de Pulga (DAPP) e Hipersensibilidade Alimentar (Noli *et al.*, 2006).

Se estiverem presentes sinais clínicos sistémicos, a Leishmaniose canina pode ser confundida com outras doenças infecciosas transmitidas por vectores, nomeadamente a Erliquiose, Hepatozoonose e Babesiose. A Erliquiose, por exemplo, apresenta sintomatologia similar à da Leishmaniose, sendo porém frequente a observação de petéquias e hemorragias, associadas a redução acentuada do número de plaquetas. A presença de linfadenopatia generalizada pode ocorrer nestas doenças infecciosas parasitárias, mas também nas doenças linfoproliferativas neoplásicas, como o linfoma maligno. Por outro lado, a poliartrite, a vasculite e a glomerulonefrite são lesões comuns do Lúpus Eritematoso Sistémico, podendo ser difícil diferenciá-lo da doença causada por *Leishmania*, visto que cerca de 30% dos cães com Leishmaniose têm título positivo, apesar de ligeiro, de anticorpos anti-nucleares (ANA) e 10% apresenta resultado positivo ligeiro no teste de Coombs, dois dos métodos de diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistémico (Noli *et al.*, 2006; Bourdeau, 2009).

O diagnóstico de Leishmaniose canina pode ainda ser dificultado pela presença de doenças concomitantes, que agravam o quadro clínico, nas quais se incluem piodermite, pneumonia bacteriana, doença gastrointestinal e Pênfigo Foliáceo. São ainda descritas, frequentemente, infecções combinadas com *Ehrlichia*, *Babesia*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma*, *Demodex* e *Dirofilaria*, quando a Leishmaniose ocorre em regiões endémicas para aqueles parasitas. Por outro lado, num estudo serológico realizado em Itália, foi possível verificar que um grande número de cães era simultaneamente seropositivo para *Leishmania infantum* e para *Neospora caninum*. O desenvolvimento destas doenças concomitantes tem sido atribuído à reduzida resposta imunitária celular presente nos animais com Leishmaniose clínica (Roze, 2005; Baneth, 2006; Noli *et al.*, 2006). É fundamental detectar precocemente as doenças que evoluem em conjunto com a Leishmaniose, para que se estabeleça a correcta abordagem terapêutica e se aperfeiçoe a monitorização do animal.

## **7. TRATAMENTO**

O tratamento da Leishmaniose canina é geralmente difícil, demorado, dispendioso e apenas parcialmente eficaz. Na maioria dos casos, não se consegue a eliminação total do protozoário, mas somente a remissão da sintomatologia (cura clínica) e a diminuição temporária da

capacidade infectante para os flebótomos (durante cerca de 4 meses), podendo ocorrer recidivas da doença ao fim de 6 meses a 2 anos. Os motivos desta ineficácia terapêutica não estão completamente esclarecidos mas podem incluir, entre outros factores, a localização intracelular do parasita, o alojamento das formas amastigotas em certos tecidos, a ausência de uma resposta imunológica celular eficaz que complemente a acção farmacológica e o desenvolvimento de resistências frente aos fármacos administrados. De facto, o aparecimento de estirpes de *Leishmania* resistentes é um sério problema, sendo consequência da escolha inadequada da dose ou da duração do tratamento (Campillo *et al*, 1999).

Por outro lado, o tratamento da Leishmaniose canina é problemático e controverso, visto que os cães infectados não têm cura e são considerados o principal reservatório da doença para a espécie humana, necessitando por isso de um controlo sanitário e de uma vigilância veterinária especial. Deste modo, a alternativa aos procedimentos terapêuticos é a eutanásia dos animais doentes. Contudo, os programas sanitários da zona Mediterrânica não contemplam esta opção, sendo a eutanásia geralmente aplicada apenas nos animais com um estado clínico de prognóstico reservado ou com recidivas constantes da doença. É importante que o Médico Veterinário elucide os proprietários sobre a doença, o seu prognóstico, os custos prováveis do tratamento e do acompanhamento clínico e as implicações da Leishmaniose canina em termos de Saúde Pública (Meireles, 2008).

A aplicação do tratamento adequado requer, previamente, um diagnóstico precoce da doença e a avaliação do estado sanitário e imunitário do animal através do exame clínico e de exames complementares, como o hemograma, o perfil bioquímico, o proteinograma e a urianálise, cujos resultados são considerados a base para posterior comparação e avaliação do tratamento (Noli *et al.*, 2006; Meireles, 2008).

Os parâmetros clinicopatológicos que devem ser monitorizados durante a terapêutica variam de acordo com os casos clínicos, mas geralmente é recomendado realizar hemograma, análises bioquímicas e urinárias, incluindo a determinação do rácio UPC nos animais proteinúricos. A frequência da monitorização destes parâmetros também varia com cada paciente, sendo, na maioria dos casos, feita mais frequentemente durante o primeiro mês de tratamento e depois a cada 3-4 meses. Mais tarde, se o animal apresentar cura clínica, a monitorização é recomendada a cada 6 meses ou uma vez por ano. É importante referir que a resposta clínica à terapêutica é muito variável nos cães doentes, uma vez que depende do seu estado clinicopatológico inicial, verificando-se, por exemplo, nos animais com IRC uma recuperação mais lenta da doença. A maioria dos cães apresenta melhoria clínica ao fim de um mês de tratamento, mas as alterações no título sérico de anticorpos e no nível das proteínas plasmáticas requerem, geralmente, mais tempo até normalizarem. Deste modo, é

recomendado repetir o teste serológico quantitativo, no mesmo laboratório, 6 meses após o início da terapêutica, visto que o nível sérico inicial de anticorpos é normalmente elevado nos animais doentes e o tempo de semi-vida das imunoglobulinas é relativamente longo. Alguns animais apresentam uma redução significativa no título de anticorpos associada a melhoria clínica ao fim de 6 meses a um ano de tratamento, enquanto outros manifestam melhoria clínica mas sem diminuição do nível de anticorpos. Por outro lado, o aumento progressivo do título de anticorpos pode indicar uma recidiva, especialmente nos animais em que houve interrupção da terapêutica (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Idealmente, o que se pretende com o tratamento do animal é a cura completa da doença, que só será confirmada após remissão da sintomatologia, normalização de todos os parâmetros clinicopatológicos, exame citológico negativo e obtenção de dois resultados negativos no PCR (preferencialmente RT-PCR) com 6 meses de intervalo entre si (Noli *et al.*, 2006).

Actualmente, existem diversos fármacos utilizados no tratamento da Leishmaniose canina, não só como terapêutica etiológica, mas também como sintomática (Meireles, 2008), e que serão seguidamente abordados.

## **7.1. Tratamento etiológico**

Existiram nos últimos anos avanços no diagnóstico e controlo da Leishmaniose canina, porém os progressos no tratamento da doença ainda são insuficientes, na medida em que nenhum dos fármacos utilizados elimina completamente a infecção, apesar de melhorarem os sinais clínicos e puderem mesmo conduzir à cura clínica do animal. Os protocolos terapêuticos e a sua monitorização têm evoluído consideravelmente, mas os fármacos essenciais para o tratamento da Leishmaniose permanecem os mesmos, havendo contudo esforços para melhorar as suas formulações e propriedades farmacocinéticas. Por outro lado, novos fármacos foram avaliados para a terapêutica desta doença, sendo quase sempre considerados em associação com os fármacos utilizados por rotina ou como tratamento alternativo nos cães que não respondem adequadamente a esses fármacos (Miró *et al.*, 2008).

### **7.1.1. Compostos antimoniais**

Ao longo das últimas décadas, os compostos antimoniais têm sido os fármacos leishmanicidas de eleição no tratamento da Leishmaniose canina e humana. Estes compostos inibem selectivamente duas enzimas do protozoário, a fosfofrutoquinase e a piruvatodesidrogenase, necessárias para a glicólise e oxidação de ácidos gordos, conduzindo à destruição do parasita. Inicialmente, eram utilizados na sua forma trivalente, mas devido à sua toxicidade, passaram a

ser empregues os compostos pentavalentes, como o **antimoniato de glucamina** (Glucantime<sup>®</sup>), mais utilizado nas zonas latinas e francófonas, e o **estibogluconato de sódio** (Pentostan<sup>®</sup>) em países anglo-saxónicos (Baneth, 2006; Meireles, 2008).

Existem vários protocolos terapêuticos onde estes compostos são utilizados, diferindo principalmente nas doses, vias de administração, duração e intervalo entre tratamentos. No caso do antimoniato de glucamina, a dose recomendada é de 100 mg/Kg em injeção diária, apesar de alguns autores duplicarem ou triplicarem a dose, mas administrando em dias alternados. A maioria dos autores recomenda 2 ou 3 séries de administrações diárias, durante 20 a 30 dias consecutivos ou em dias alterados, com um intervalo em cada série de 15 dias a um mês. A via de administração do antimoniato de glucamina pode ser subcutânea, endovenosa ou intramuscular, sendo recomendada a primeira via, visto que permite maior permanência do fármaco no organismo e origina menor reação inflamatória local. Por vezes, a via intramuscular pode originar abscessos, hemorragias, fibrose e claudicação, devido ao volume inoculado e à frequência de administração, enquanto a inoculação endovenosa pode conduzir a flebite e conseqüentemente a trombose. O estibogluconato de sódio é administrado na dose de 10-20 mg/Kg, por via intramuscular, e em protocolos semelhantes ao do antimoniato de glucamina (Baneth, 2006; Meireles, 2008).

Os compostos antimoniais pentavalentes são rapidamente excretados na urina (excreção renal de 80% do fármaco nas 9 horas após administração) e apenas uma pequena percentagem é convertida na forma trivalente tóxica, que posteriormente se acumula no organismo. Contudo, as doses recomendadas, raramente, originam sinais de toxicidade, a não ser que a administração seja diária, por um período de tempo superior a 2 meses, ou seja feita em animais com insuficiência renal, cardíaca ou hepática (Roze, 2005; Baneth, 2006). Deste modo, os fabricantes dos compostos antimoniais propõem a redução das doses terapêuticas nas primeiras administrações, quando os pacientes apresentam lesões renais ou hepáticas ou para testar as possíveis reações de intolerância. Estas manifestam-se por mialgia, vômito, diarreia, dor abdominal, apatia, alterações renais, hepáticas e pancreáticas (Meireles, 2008).

A grande maioria dos cães com Leishmaniose, com exceção daqueles que apresentam graves alterações hepáticas e renais, demonstra uma recuperação clínica evidente durante o tratamento com os compostos antimoniais. Contudo, estes fármacos não previnem as recidivas, que ocorrem em cerca de 75% dos casos, nos anos seguintes ao tratamento, sendo necessária a sua repetição anual ou ainda com maior frequência. Estas recidivas estão associadas a diferenças genéticas, imunológicas, fisiológicas ou farmacocinéticas do hospedeiro, a diferentes graus de concentração parasitária nos tecidos e a resistências ao tratamento, resultantes da administração inadequada destes fármacos (Noli *et al.*, 2006;

Meireles, 2008). É de referir ainda que a utilização a longo prazo dos compostos antimoniais pode tornar-se dispendiosa (Roze, 2005).

### 7.1.2. Miltefosina

A **miltefosina** é uma alquilfosfocolina desenvolvida inicialmente como um quimioterápico anti-neoplásico, tendo sido posteriormente descoberta a sua acção leishmanicida (Roze, 2005). Este fármaco apresenta uma estrutura similar aos compostos metabolizados pela *Leishmania*, actuando por inibição da síntese da membrana celular do protozoário e por rotura das vias de sinalização celular na membrana parasitária. Contudo, a miltefosina não actua apenas directamente por destruição das formas promastigotas extracelulares e das formas amastigotas, visto que estimula ainda a activação de macrófagos e de células T e a produção de metabolitos de oxigénio e de monóxido de azoto (Baneth & Shaw, 2002; Meireles, 2008). O Milteforan<sup>®</sup>, recentemente comercializado em Portugal, consiste numa solução com 20 mg/mL de miltefosina, sendo recomendada a dose de 2 mg/Kg/dia, por via oral, durante 28 dias. Este fármaco tem demonstrado uma rápida absorção gastrointestinal, baixa depuração plasmática e uma ampla distribuição nos órgãos alvo, onde permanece activo e disponível por um longo período de tempo. Além destas características farmacocinéticas, a miltefosina apresenta uma lenta metabolização hepática em colina (um composto natural, não prejudicial), é apenas em parte excretada pelas fezes (cerca de 10% da dose administrada) e possui a vantagem de não ser eliminada pela via renal, podendo assim ser indicada para os cães com IRC, sem necessidade de ajustar a dose normalmente aplicada. Este fármaco tem permitido obter uma excelente resposta clínica nos animais com Leishmaniose, sendo raros os efeitos adversos, nos quais estão incluídos salivação, diarreia e vómito. Por outro lado, estudos demonstraram que a miltefosina apresenta toxicidade reprodutiva, não devendo ser administrada a cadelas gestantes ou em lactação e nos animais reprodutores (Meireles, 2008; Oliva *et al.*, 2008). De salientar que o custo do tratamento com este fármaco é geralmente elevado (Noli *et al.*, 2006).

### 7.1.3. Análogos das purinas

O **alopurinol** é um análogo estrutural da hipoxantina, habitualmente empregue na Medicina Humana no tratamento da gota (Meireles, 2008). Em Medicina Veterinária, é utilizado na prevenção da formação de cálculos de urato, pois intervém na síntese do ácido úrico através da inibição da xantina oxidase, mas também é administrado no tratamento da Leishmaniose canina. (Roze, 2005; Oliva *et al.*, 2008). O alopurinol (Zyloric<sup>®</sup>) apresenta uma acção

leishmaniostática, que está relacionada com a incapacidade do protozoário em sintetizar purinas, levando-o a recorrer à metabolização deste fármaco para produzir um análogo de inosina. Este é posteriormente incorporado no ácido ribonucleico (RNA) da *Leishmania*, causando alterações na síntese proteica e inibição da multiplicação parasitária (Baneth, 2006; Noli *et al.*, 2006).

De acordo com diversos autores, as doses recomendadas deste fármaco encontram-se entre 5-40 mg/Kg/dia, mais frequentemente 20 mg/Kg/dia, sendo administradas por via oral, durante um período de 2 a 24 meses ou mesmo durante toda a vida do animal (Roze, 2005; Meireles, 2008; Oliva *et al.*, 2008).

Nos cães que são submetidos a alopurinol em monoterapia, durante um período mínimo de 2-3 meses, verifica-se quase sempre um melhoramento clínico e, em parte, dos parâmetros laboratoriais, com redução da carga parasitária. Esta redução permite diminuir ou manter estável o grau de proteinúria, nos animais doentes proteinúricos, e prevenir ou retardar o deterioração da função renal nos cães infectados não azotémicos. Contudo, este fármaco não possibilita a cura parasitológica, ocorrendo recidivas, sobretudo quando há suspensão da terapêutica (Oliva *et al.*, 2008). A interrupção do alopurinol deve ser decidida pelo Médico Veterinário, após avaliação clínica, serológica e parasitológica do animal. Deste modo, a remissão da sintomatologia e a normalização dos parâmetros laboratoriais, pelo menos um ano depois do início do tratamento com alopurinol, ou a redução acentuada do título de anticorpos anti-*Leishmania*, podem ser critérios suficientes para a interrupção deste fármaco, apesar de em alguns animais, considerados extremamente susceptíveis, nunca se conseguir obter estes resultados (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Como principais vantagens desta terapêutica destaca-se a facilidade de aquisição e de administração, o custo relativamente baixo e a reduzida toxicidade. Na realidade, estão descritos poucos efeitos secundários, nomeadamente hiperxantinúria com formação de urólitos de xantina. Por estas razões, a utilização do alopurinol no tratamento da Leishmaniose canina é crescente, seja como monoterapia ou em associação com outros fármacos, como os compostos antimoniais (Roze, 2005; Baneth, 2006).

#### **7.1.4. Anfotericina B**

A **anfotericina B** é um antibiótico macrólido, utilizado primeiramente como terapêutica antifúngica, mas que apresenta actividade contra alguns protozoários, nomeadamente *Leishmania* (Baneth, 2006). O seu mecanismo de acção consiste na ligação irreversível ao ergosterol, o

principal componente da membrana celular parasitária, causando alterações na sua permeabilidade e conseqüentemente a morte do protozoário (Noli *et al.*, 2006).

As doses mais utilizadas variam com os diversos autores, estando situadas entre 0,1-1 mg/Kg, diluída em soro fisiológico e administrada por via endovenosa lenta, em dias alternados, durante dois meses (Meireles, 2008).

A anfotericina B tem também afinidade para o colesterol dos mamíferos, o que a torna extremamente tóxica, em particular a nível renal, causando diminuição da perfusão sanguínea do rim, redução da taxa de filtração glomerular, necrose dos túbulos renais e azotémia. Outros efeitos secundários descritos incluem anorexia, vômito, hipertermia, flebite, anemia, hipocalémia e icterícia (Noli *et al.*, 2006; Meireles, 2008).

Apesar de ser considerada mais efectiva no tratamento da Leishmaniose canina que os compostos antimoniais, a sua utilização está limitada aos casos de insucesso daqueles compostos, devido ao risco de desenvolvimento de resistências, ao elevado preço, à toxicidade e à dificuldade de preparação e de administração (Roze, 2005; Noli *et al.*, 2006).

#### **7.1.5. Aminosidina**

A **aminosidina** ou **paromomicina** é um antibiótico aminoglicosídeo, que actua por inibição da síntese proteica do protozoário, sendo a dose preconizada de 5-10 mg/Kg, administrada a cada 12 horas, por via intramuscular ou subcutânea, durante três semanas (Noli *et al.*, 2006; Meireles, 2008). Não é, no entanto, recomendada como terapêutica de primeira escolha devido à sua nefrotoxicidade e ototoxicidade (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Pode ser instituída como monoterapia ou, preferencialmente, em associação com os compostos antimoniais, visto que dessa forma se potencia a sua persistência no sangue, permitindo a redução das doses, o aumento do intervalo entre administrações e a diminuição da carga parasitária medular e ganglionar, dos títulos de anticorpos e das recidivas da doença (Meireles, 2008; Oliva *et al.*, 2008).

#### **7.1.6. Diamidinas**

As diamidinas, nomeadamente a **pentamidina**, são fármacos anti-fúngicos e anti-protozoários, utilizados como segunda escolha no tratamento da Leishmaniose canina ou em caso de insucesso terapêutico com os compostos antimoniais. O seu mecanismo de acção consiste na perturbação do metabolismo das proteínas e dos ácidos nucleicos e nas alterações das mitocôndrias, ribossoma, cinetoplasto e bolsa flagelar da *Leishmania* (Meireles, 2008; Oliva *et al.*, 2008). A dose de pentamidina mais frequente é de 4 mg/Kg, administrada por via

intramuscular profunda, duas a três vezes por semana, durante 4 a 7 semanas (Meireles, 2008). Está descrito que estes fármacos melhoram o estado clínico, reduzem a resposta humoral e induzem uma boa resposta imunológica celular nos cães com Leishmaniose (Roze, 2005; Oliva *et al.*, 2008). No entanto, as diamidinas apresentam uma eficácia inferior e toxicidade superior quando comparadas com os antimoniais pentavalentes. Os seus efeitos secundários manifestam-se por nefrite, hepatite, dor abdominal, vômito, diarreia, hipotensão, hipoglicémia, trombocitopénia, choque anafilático, síncope e abscessos musculares (Meireles, 2008; Oliva *et al.*, 2008).

#### 7.1.7. Quinolonas

As fluoroquinolonas são antibióticos que recentemente foram propostos para o tratamento da Leishmaniose canina, dos quais se destacam a **marbofloxacina** e a **enrofloxacina**. O seu mecanismo de acção ainda não está completamente esclarecido, mas estudos *in vitro* sugerem que estes fármacos interferem na replicação do ADN parasitário, assim como estimulam a actividade leishmanicida dos macrófagos infectados. A enrofloxacina parece ter menor acção contra o protozoário e, quando utilizada em monoterapia, conduz a um melhoramento clínico apenas temporário. Por outro lado, a marbofloxacina pode representar um fármaco alternativo promissor para o tratamento da Leishmaniose canina, tendo sido sugerida a dose de 2 a 5 mg/Kg/dia, durante 28 dias, apesar de ainda serem necessários mais estudos que confirmem a sua actividade nos cães naturalmente infectados com o género *Leishmania* (Roze, 2005; Vouldoukis *et al.*, 2006; Oliva *et al.*, 2008).

#### 7.1.8. Derivados do imidazol

Os **imidazóis** são compostos anti-fúngicos que inibem a síntese dos esteróis das membranas celulares e dos ácidos nucleicos do protozoário, através da formação de complexos com o ADN parasitário, assim como intensificam o processo de glucogénese, provocando a depleção das reservas glucogénicas e consequentemente a morte da *Leishmania*. Nesta terapêutica de segunda escolha da Leishmaniose canina estão incluídos o metronidazol, o cetoconazol e o itraconazol. O metronidazol é utilizado na dose de 10 a 15 mg/Kg, a cada 12 horas, por via oral, durante 15 dias, enquanto o itraconazol é recomendado na dose de 4 mg/Kg/dia, também por via oral, mas durante 6 semanas. No caso do cetoconazol, os resultados obtidos têm sido irregulares e devido à sua nefrotoxicidade não deve ser administrado em cães com azotémia. A dose de cetoconazol habitualmente instituída é de 7 mg/Kg/dia (pode ser 25 mg/Kg/dia), por via oral, durante 3 meses (Campillo *et al.*, 1999; Meireles, 2008).

### 7.1.9. Outros fármacos

Na sequência da Leishmaniose canina surgem alterações imunológicas acentuadas que justificam a utilização de fármacos moduladores do sistema imunitário (imunossupressores e imunostimulantes). Os **compostos imunossupressores** utilizados nesta doença são os corticosteróides, nomeadamente a prednisona e prednisolona, especialmente nos casos em que existe deposição de complexos imunes e consequentemente glomerulonefrite, uveíte e/ou poliartrite. Na presença de nefropatia, estes fármacos são associados ao alopurinol ou a doses reduzidas dos antimoniais pentavalentes (50 mg/Kg/dia), até os níveis plasmáticos de ureia e creatinina normalizarem. A dose recomendada de prednisona e prednisolona é de 1-2 mg/Kg/dia, via oral. Contudo, esta terapêutica ainda é controversa, devido aos efeitos colaterais dos corticosteróides (Roze, 2005; Meireles, 2008). Os principais **compostos imunostimulantes** são o levamisol e as citocinas recombinantes. O levamisol é um anti-helmíntico, que estimula a diferenciação dos linfócitos T e a fagocitose nos humanos, mas cuja actividade nos cães não está devidamente esclarecida. Contudo, alguns autores referem a utilização deste fármaco, em associação com a terapêutica convencional, na dose de 0,5 a 2 mg/Kg, em dias alternados, durante um período de 12 dias a 2 meses (Meireles, 2008). As citocinas recombinantes, como o interferão- $\gamma$  e as interleucinas (IL-12 e IL-18), parecem contribuir para a conversão da resposta imunitária do tipo Th2 numa resposta imunológica protectora do tipo Th1. No entanto, a sua administração nos canídeos ainda é limitada, dispendiosa e requer estudos mais aprofundados (Roze, 2005; Meireles, 2008).

A utilização de **domperidona** (um antagonista da dopamina), em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, permite o aumento dos níveis plasmáticos da prolactina, melhorando a resposta imunitária celular e reduzindo a sintomatologia e os títulos de anticorpos nos animais doentes. Estas alterações são contudo menos evidentes nos cães com um quadro sintomatológico mais grave. A dose de domperidona utilizada nestes estudos foi de 1 mg/Kg, a cada 12 horas, durante 1 mês, por via oral (Oliva *et al.*, 2008).

### 7.1.10. Associação de fármacos

A associação entre o **alopurinol e os compostos antimoniais** é o protocolo terapêutico mais utilizado na Leishmaniose canina, visto que permite uma remissão clínica mais duradoura que a obtida quando são administrados em monoterapia. Por outro lado, existe uma boa tolerância dos animais a esta associação farmacológica. O protocolo normalmente aplicado inclui o antimoniato de glucamina na dose de 100 mg/Kg/dia (ou 50 mg/Kg, a cada 12 horas), por via subcutânea, durante um ou dois meses, e o alopurinol na dose de 10 mg/Kg, a cada 12 horas,

por via oral, durante meses ou toda a vida, como é sugerido por alguns autores. Contudo, regra geral não é alcançada a cura parasitológica e é possível a ocorrência de recidivas, apesar da continuação do tratamento (Oliva *et al.*, 2008).

Por outro lado, estudos têm demonstrado que a combinação do **alopurinol com a miltefosina** apresenta eficácia clínica, compatibilidade e ausência de efeitos adversos ou tóxicos. Esta associação contribui assim para a melhoria do estado clínico do animal, para a normalização dos parâmetros laboratoriais e para a redução da carga parasitária, sem terem sido detectadas diferenças significativas comparativamente com o protocolo terapêutico anterior (Meireles, 2008; Oliva *et al.*, 2008).

O metronidazol pode ser associado a antibióticos como a enrofloxacina ou a espiramicina para o tratamento da Leishmaniose. No caso da associação do **metronidazol com a espiramicina**, ambos com actividade anti-protozoária e estimuladora do sistema imunitário, verificou-se que ocorre um melhoramento do quadro clínico e das análises laboratoriais, também sem diferenças relativas ao protocolo que junta o alopurinol e os compostos antimoniais. A dose utilizada de metronidazol é de 25 mg/Kg/dia, via oral, e de espiramicina é de 150.000 UI/Kg/dia, por via oral, durante 90 dias (Noli *et al.*, 2006; Oliva *et al.*, 2008).

Tendo em conta o estadiamento da Leishmaniose canina, anteriormente referido, é recomendado: no estadio I (doença ligeira) apenas o acompanhamento do paciente ou a administração de alopurinol em monoterapia ou associado aos compostos antimoniais ou à miltefosina, no estadio II (doença moderada) e III (doença grave) a combinação do alopurinol com o antimoniato de glucamina ou com a miltefosina e no estadio IV (doença muito grave) a instituição de alopurinol como monoterapia. É necessário ainda realizar a abordagem terapêutica apropriada às alterações renais presentes nesses estadios, de acordo com a IRIS (Miró *et al.*, 2010).

É importante referir que a presença de co-infecções agrava o quadro clínico do animal e pode dificultar a eficácia da terapêutica instituída contra a Leishmaniose canina. Nesse caso, após o correcto diagnóstico das doenças concomitantes, deve proceder-se ao seu tratamento específico e à estabilização do paciente, para que dessa forma se possam obter os resultados desejados com a terapêutica anti-*Leishmania*.

## **7.2. Tratamento sintomático**

A maioria dos cães com Leishmaniose necessita de um tratamento de suporte, antes ou em simultâneo com o tratamento etiológico, de forma a controlar as complicações secundárias desta doença. Deste modo, de acordo com o caso clínico, a terapêutica sintomática

seleccionada pode incluir antibioterapia de largo espectro de acção, fluidoterapia, anti-inflamatórios, reconstituintes, dietas hipoproteicas, transfusões sanguíneas e medidas terapêuticas efectivas na IRC (Meireles, 2008).

### **7.2.1. Medidas terapêuticas aplicadas na Insuficiência Renal Crónica canina**

O tratamento da IRC deve ser adaptado a cada caso clínico e depende muito da gravidade da doença renal no momento de diagnóstico (Tabela 8) e da dedicação e disponibilidade do proprietário, uma vez que a terapêutica será instituída até ao final de vida do seu animal. É importante ter em conta que este tratamento não reverte ou elimina, necessariamente, as lesões renais responsáveis pela IRC. Deste modo, o Médico Veterinário deve avaliar, com regularidade, a eficácia da terapêutica e a progressão da doença, através da monitorização clínica e laboratorial do paciente, alterando os protocolos aplicados de acordo com a resposta desenvolvida. Além disso, deve-se utilizar com precaução todos os fármacos cuja eliminação é predominantemente renal, sobretudo nos estadios mais avançados de IRC, podendo ser necessário ajustar as suas doses (Elliott & Lefebvre, 2008; Cortadellas, 2009b).

A terapêutica aplicada na IRC está direccionada para o controle daqueles factores que se acredita contribuir para a progressão da doença renal, como a hipertensão sistémica e glomerular, a proteinúria e as alterações no metabolismo mineral. Pretende também melhorar os sinais clínicos consequentes do síndrome urémico, minimizar as complicações resultantes da alteração no equilíbrio ácido-base e hidro-electrolítico e fornecer o suporte nutricional e energético adequado. Assim, ao retardar a progressão da doença renal e ao melhorar o estado geral, é possível aumentar a qualidade de vida e incrementar o tempo de sobrevivência nos cães afectados por esta doença (Elliott & Lefebvre, 2008; Cortadellas, 2009b).

A **hipertensão** é uma complicação frequente da IRC, estando recomendada a terapêutica anti-hipertensiva nos cães com pressão arterial sistémica persistentemente superior a 160 mmHg, mesmo sem haver lesão multi-orgânica, e em todos os animais onde estejam presentes implicações sistémicas de hipertensão (Cortadellas, 2009b). O objectivo desta terapêutica é reduzir a pressão arterial sistémica até valores inferiores a 160 mmHg e minimizar os riscos de lesão cardíaca, ocular e/ou neurológica. No entanto, estes objectivos só são conseguidos a longo prazo, devendo existir uma redução gradual e sustentada da pressão arterial, de forma a evitar uma diminuição abrupta que conduza a hipotensão. Esta manifesta-se quando existe uma pressão arterial inferior a 120 mmHg e/ou a presença de sinais clínicos como taquicardia e fraqueza. Os animais hipertensos normalmente necessitam desta terapêutica ao longo da sua

vida, sendo fundamental a sua monitorização frequente, pelo menos a cada 3 meses após a estabilização (IRIS, 2009b).

A restrição de sódio na dieta do animal pode ser utilizada para ajudar no controlo da pressão arterial, mas na maioria dos casos necessita de ser associada à terapêutica farmacológica (IRIS, 2009b). Os fármacos anti-hipertensivos incluem diuréticos, antagonistas adrenérgicos, inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA's), bloqueadores dos canais de cálcio e vasodilatadores (Elliott & Lefebvre, 2008). Contudo, os IECA's são os mais utilizados porque além de terem efeito na pressão arterial sistémica, também reduzem a pressão intraglomerular e a gravidade da proteinúria, permitindo retardar a progressão da doença renal. A dose recomendada de enalapril é de 0,5 mg/Kg, por via oral, cada 12 ou 24 horas, enquanto o benazepril é recomendado na dose de 0,25-0,5 mg/Kg/dia, por via oral (Elliott & Lefebvre, 2008; Cortadellas, 2009b), podendo no entanto em alguns pacientes ser necessário aumentar a dose destes fármacos para melhorar o efeito anti-hipertensivo. Quando a resposta a esta terapêutica não é suficiente está indicada a associação do IECA a um bloqueador dos canais de cálcio, como a amlodipina (0,05 a 0,3 mg/Kg, via oral, cada 12 ou 24 horas). Nos casos em que esta associação não funciona, foi sugerida a combinação do IECA e da amlodipina a um vasodilatador arterial (hidralazina, 0,5-2 mg/Kg, via oral, cada 8 ou 12 horas) ou a um antagonista  $\beta$ -adrenérgico (propranolol, 0,1-1 mg/Kg, via oral, cada 8 ou 12 horas) (Elliott & Lefebvre, 2008; IRIS, 2009b).

O controlo da **proteinúria** é uma parte importante do tratamento da IRC, uma vez que foi verificado que nos cães com rácio UPC superior ou igual a 1,0 existe maior probabilidade de ocorrer síndrome urémico e morte (Cortadellas, 2009b). Nos animais proteinúricos, para além de ser importante utilizar uma dieta com restrição proteica, é recomendada a administração de IECA's, com o intuito de modular a pressão intraglomerular, reduzindo o nível de proteinúria (Waki *et al.*, 2010). O momento de intervenção contra a proteinúria difere de acordo com o estadio da IRC. Num animal não azotémico (estadio I e início do estadio II) existe um elevado número de nefrónios funcionais, através dos quais pode haver perda proteica. Deste modo, deve haver uma investigação e monitorização rigorosa dos animais que estejam nesses estadios e sejam considerados proteinúricos no limite ou tenham níveis reduzidos de proteinúria ( $UPC < 2,0$ ), enquanto nos cães com estadio II-IV a terapêutica deve ser instituída para valores inferiores do rácio UPC (IRIS, 2009b).

É importante que seja feita a monitorização da resposta ao tratamento e da progressão da doença renal, considerando-se uma boa resposta quando a concentração plasmática da creatinina estabiliza e o rácio UPC decresce. Por outro lado, o aumento progressivo da

creatinina sérica e/ou a subida do rácio UPC indicam que a IRC está a progredir. Geralmente, a terapêutica é mantida ao longo da vida do animal, mas se a Leishmaniose estiver controlada, as doses utilizadas podem ser reduzidas, continuando-se porém a monitorizar o rácio UPC (IRIS, 2009b).

Nos animais com Leishmaniose canina e IRC, associados a proteinúria, está recomendada a utilização do ácido acetilsalicílico, independentemente dos níveis plasmáticos de creatinina e sobretudo se a albumina sérica for inferior a 2 g/dL. A administração oral de uma dose baixa deste fármaco (0,05-0,5 mg/Kg/dia), permite reduzir a agregação plaquetária e assim prevenir a **hipercoagulabilidade** consequente do síndrome nefrótico, sem alterar o perfil de coagulação e sem prejudicar a função renal (IRIS, 2009b; CLWG, 2007). No caso de o animal apresentar **edema e/ou ascite**, o ideal seria o repouso e a utilização de uma dieta com restrição de sódio, mas nos casos mais graves pode ser necessário administrar diuréticos. A administração dos mesmos deve ser feita em doses reduzidas, devido ao risco de provocarem uma redução acentuada da perfusão renal e consequentemente resultar numa descompensação aguda do paciente. Por outro lado, a drenagem do líquido é reservada para os casos onde existe dispneia, sendo recomendado drenar apenas a quantidade mínima necessária para melhorar o quadro clínico do animal (Cortadellas, 2009a).

Os animais com IRC apresentam geralmente diminuição da capacidade de concentrar a urina e polidipsia, para compensar a excessiva perda de fluidos resultante da poliúria. Contudo, alguns pacientes não ingerem a quantidade suficiente de água, conduzindo a **desidratação** e a redução da perfusão renal, o que permite a progressão da IRC e aumenta o risco de crise urémica. Deste modo, é fundamental que esteja sempre disponível água fresca *ad libitum* e que seja restabelecido o equilíbrio hidro-electrolítico através de fluidoterapia (Elliott & Lefebvre, 2008; Cortadellas, 2009b).

Nos pacientes em que existe crise urémica ou um declínio acentuado da função renal a fluidoterapia deve ser instituída de forma agressiva durante as primeiras 6-12 horas, por via endovenosa, seleccionando-se preferencialmente os cristalóides isotónicos, como o Lactato de Ringer. Durante esta fase de rehidratação rápida é importante que haja uma monitorização frequente do animal em virtude do risco de hiperhidratação. Após a correcção da desidratação, os principais objectivos da fluidoterapia são manter o animal hidratado, através da administração de fluidos de manutenção, e repor as perdas contínuas (urina, vómito, diarreia), de forma a evitar a hipoperfusão renal e o agravamento da azotémia. Quando o estado clínico do animal evolui favoravelmente, a fluidoterapia endovenosa pode ser gradualmente reduzida e passar a ser administrada por via subcutânea (Polzin, 2009). Esta forma de administração é

uma alternativa que pode ser aplicada nos cães que necessitam de um fornecimento regular de fluidos, podendo ser exercida em casa, pelo dono do animal, 2 a 3 vezes por semana. As principais complicações associadas à administração crónica das soluções electrolíticas são hiperhidratação, hipertensão e hipernatrémia (Cortadellas, 2009b). É importante referir que nos animais desidratados e/ou com sinais de hipovolémia está contra-indicada a administração de IECA's, visto que nessas condições estes fármacos reduzem precipitadamente a taxa de filtração glomerular, sendo por isso fundamental corrigir a desidratação antes da sua administração (IRIS, 2009b).

A correcção da **hiperfosfatémia** limita o desenvolvimento do hiperparatiroidismo secundário renal, a osteodistrofia renal, a calcificação dos tecidos moles e a progressão da doença renal. Foi demonstrado que a retenção de fósforo começa nos estadios iniciais de IRC, tendo sido estabelecidos níveis de fosfatémia, específicos para cada estadio, a partir dos quais deve haver intervenção terapêutica. Inicialmente, o controlo dos níveis de fósforo é exercido através da restrição deste componente na dieta, mas esta medida torna-se insuficiente com a progressão da IRC. Nestes casos, é recomendada a utilização de quelantes intestinais do fósforo (Elliott & Lefebvre, 2008; Cortadellas, 2009b). Estes são administrados por via oral juntamente com o alimento, combinam-se com o fósforo da dieta a nível intestinal, formando complexos insolúveis que são eliminados pelas fezes. Estão disponíveis diversos tipos de quelantes, podendo conter alumínio (hidróxido, carbonato e óxido de alumínio) ou cálcio (carbonato, acetato e citrato de cálcio). A dose inicial é de 30-60 mg/Kg/dia, dividida pelas várias refeições do animal, porém a dose necessária varia de acordo com os níveis de fósforo ingeridos e com o estadio da IRC. É importante que seja feita a monitorização das concentrações de cálcio e fósforo cada 4-6 semanas até estabilização e depois a cada 12 semanas. A utilização prolongada de quelantes que contenham alumínio pode conduzir a sinais de toxicidade, como microcitose e/ou fraqueza muscular generalizada, sendo aconselhado mudar de composto. Os quelantes constituídos por cálcio podem originar hipercalcémia, sendo aconselhado associá-los aos quelantes que contêm alumínio. Contudo, o citrato de cálcio não deve ser combinado com os sais de alumínio, visto que aumenta a absorção intestinal deste mineral (Elliott & Lefebvre, 2008; IRIS, 2009b).

Uma das consequências da retenção de fósforo e da perda de tecido funcional do rim é a redução progressiva da concentração de calcitriol. Deste modo, está recomendada a administração de calcitriol nos estadios mais avançados de IRC (estadios III e IV), na dose de 1,5-6 ng/Kg/dia, por via oral. Esta terapêutica só pode ser instituída quando a concentração sanguínea de fósforo está normalizada, para evitar a calcificação dos tecidos moles, e exige

uma monitorização sequencial dos níveis séricos de fósforo, cálcio e da PTH. O calcitriol não deve ser fornecido com a dieta porque favorece a absorção intestinal de cálcio e fósforo, havendo o risco de surgir hipercalcémia (Elliott & Lefebvre, 2008; IRIS, 2009b).

A **hipocalémia** foi identificada apenas num número reduzido de cães com IRC, sendo possível fazer uma suplementação oral com gluconato de potássio (0,5 mEq/Kg, cada 12 ou 24 horas) ou citrato de potássio (40-60 mg/Kg, cada 8 ou 12 horas). Estas medidas terapêuticas permitem resolver a fraqueza muscular, consequente da hipocalémia, ao fim de 5 dias, podendo ter como efeitos secundários náusea, vômito e ulceração gastrointestinal. A dose destes suplementos deve ser ajustada de acordo com a concentração plasmática de potássio e com a resposta ao tratamento (Elliott & Lefebvre, 2008).

A **acidose metabólica** é uma complicação frequente nos animais com IRC, devendo iniciar-se a administração oral de agentes alcalinizantes (bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, citrato de potássio) quando o CO<sub>2</sub> total ou a concentração de bicarbonato forem inferiores a 18 mmol/L. O bicarbonato de sódio é o agente alcalinizante utilizado com maior frequência, na dose de 8-12 mg/Kg, cada 8 ou 12 horas, devendo ser evitado nos animais hipertensos por contribuir para o aumento da concentração de sódio. O carbonato de cálcio, por sua vez, deve ser administrado cautelosamente nos animais com hiperfosfatémia, porque predispõe para a calcificação dos tecidos. O citrato de potássio é o agente alcalinizante indicado nos animais que apresentam simultaneamente hipocalémia e acidose metabólica. Esta terapêutica alcalinizante permite melhorar a sintomatologia e previne o catabolismo proteico resultante da acidose metabólica, sendo importante reavaliar rotineiramente o estado ácido-base do paciente (Elliott & Lefebvre, 2008).

A **anemia** está frequentemente associada à IRC, contribuindo para a sua progressão através da hipóxia (Cortadellas, 2009b). O tratamento da anemia é normalmente realizado quando o hematócrito é inferior a 20% e pode incluir transfusões sanguíneas, esteróides anabólicos e eritropoietina recombinante humana (r-HuEPO). A transfusão de sangue é útil quando é necessário corrigir rapidamente a anemia, apesar de ter um efeito transitório e de haver risco de reacção transfusional com a repetição deste procedimento médico (Elliott & Lefebvre, 2008; IRIS, 2009b). Os esteróides anabólicos, como o decanoato de nandrolona (1-1,5 mg/Kg, via intramuscular, cada 7 dias), estimulam a diferenciação dos precursores dos eritrócitos na medula óssea, activam a eritropoietina renal e reduzem o catabolismo proteico. No entanto, são necessários meses de tratamento com estes fármacos para que a resposta clínica seja evidente, sendo mínimos os seus benefícios (Nelson & Couto, 2003). Por outro

lado, a utilização de r-HuEPO permite o aumento do hematócrito, do apetite e da qualidade de vida do animal. Esta terapêutica é iniciada com a dose de 100 U/Kg, por via subcutânea, três vezes por semana, monitorizando semanalmente o hematócrito, que geralmente normaliza ao fim de 2-8 semanas de tratamento. Quando este atinge valores de 35-40% a administração de r-HuEPO passa a ser feita duas vezes por semana. Como efeitos secundários podem-se destacar a policitémia, vômito, hipertensão, febre e dor no local de inoculação. Além destes efeitos, alguns animais podem desenvolver anticorpos anti-r-HuEPO, resultando numa anemia refractária, semanas ou meses após o início do tratamento. Nestes casos deve ser interrompida a administração de r-HuEPO e se necessário realizar transfusões sanguíneas, até normalização do hematócrito (Elliott & Lefebvre, 2008). O tratamento com r-HuEPO, apesar de ser o mais efectivo, não está aprovado para utilização veterinária, estando em desenvolvimento uma eritropoietina recombinante canina, que irá evitar a produção de anticorpos. Recentemente foi sugerida a administração de darbepoetina alfa nos animais com IRC porque apresenta um tempo de semi-vida superior ao da r-HuEPO, o que permite obter os mesmos efeitos clínicos com menor número de administrações, havendo menos animais que desenvolvem anticorpos neutralizantes (Cortadellas, 2009b; IRIS, 2009b). Devido à rapidez da eritropoiese, desencadeada por estes fármacos, e à redução das reservas de ferro, características dos animais com IRC, pode ser necessário fornecer suplementos orais como o sulfato ferroso, na dose de 100-300 mg/dia (Elliott & Lefebvre, 2008).

Uma elevada percentagem de cães nos estadios III e IV de IRC apresentam **sintomatologia gastrointestinal**, nomeadamente anorexia, ulceração, vômito e diarreia. Nestes casos é benéfica a utilização de anti-eméticos como a metoclopramida (0,1-0,5 mg/Kg, via subcutânea, cada 6 ou 8 horas) ou alternativamente a clorpromazina (0,2-0,5 mg/Kg, via subcutânea, cada 6 ou 8 horas). Podem ainda ser administrados antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> da histamina, como a ranitidina (0,5-2 mg/Kg, via endovenosa, cada 8 ou 12 horas), a famotidina (0,5-1 mg/Kg, via endovenosa, cada 12 ou 24 horas) ou a cimetidina (2,5-5 mg/Kg, via endovenosa, cada 6 ou 8 horas), inibidores das bombas de prótons (omeprazol, 0,5-1 mg/Kg/dia, via oral) e/ou agentes protectantes (sucralfato, 0,5-1 g, via oral, cada 6 ou 8 horas), que previnem a formação de úlceras gastrointestinais (Elliott & Lefebvre, 2008; Cortadellas, 2009b).

Além da terapêutica farmacológica, é fundamental haver um correcto **manejo alimentar** dos cães com Leishmaniose e IRC. Normalmente são prescritas dietas renais terapêuticas, que apresentam restrição de sódio, proteína e fósforo e elevados níveis de fibra solúvel, vitaminas do complexo B, antioxidantes (vitaminas A e E, taurina, flavonóides, carotenóides) e ácidos

gordos de cadeia longa ómega-3, mantendo um efeito neutro sobre o equilíbrio ácido-base. Verificou-se que a utilização destas dietas permite reduzir os episódios de crise urémica e a mortalidade nos cães com estadio III e IV de IRC, sendo ainda benéficas na manutenção dos animais proteinúricos, mas que se encontram nos estádios iniciais da doença renal (Elliott & Lefebvre, 2008; Cortadellas, 2009b). Por outro lado, alguns autores consideram importante o fornecimento desta dieta terapêutica nos cães com azotémia, independentemente da presença ou ausência de proteinúria. A suplementação com ácidos gordos de cadeia longa ómega-3 parece ter um efeito protector do rim, visto que previne a deterioração da filtração glomerular e mantém baixos os níveis de proteinúria. É de salientar que o peso do animal pode diminuir durante o tratamento dietético por duas razões principais: a dieta não satisfaz as suas necessidades nutricionais diárias ou este não ingere adequadamente as refeições oferecidas. No primeiro caso, está indicado aumentar as quantidades cedidas ao animal ou experimentar uma dieta diferente, enquanto no segundo caso é recomendado identificar os factores que conduzem a anorexia (por exemplo úlceras gastrointestinais) e tratá-los adequadamente. (CLWG, 2007). A redução da ingestão do alimento conduz a má nutrição, o que afecta negativamente a função imunitária, a cicatrização de feridas e aumenta a fragilidade, morbidade e mortalidade. Assim, deve-se prevenir a desnutrição do animal e se necessário considerar a colocação de um tubo de alimentação, que facilite a administração de medicamentos e a manutenção da ingestão calórica e da hidratação do paciente (Elliott & Lefebvre, 2008; IRIS, 2009b).

**Tabela 8 – Recomendações terapêuticas para a IRC canina (Adaptado de IRIS, 2009b)**

Estadio	Recomendações terapêuticas da IRIS
I Não Azotémico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interromper todos os fármacos potencialmente nefrotóxicos</li> <li>- Identificar e tratar alterações pré ou pós-renais</li> <li>- Excluir condições tratáveis como pielonefrite ou urolitíase renal</li> <li>- Corrigir desidratação/hipovolemia com fluidos IV e SC e água fresca <i>ad libitum</i></li> <li>- Corrigir hipertensão quando existe lesão multi-orgânica ou PA sistólica <math>\geq 160</math>mmHg</li> <li>- Tratar e monitorizar proteinúria quando rácio UPC &gt; 2,0</li> </ul>
II Azotémia Renal Ligeira	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Todos os itens indicados no estadio I e o seguinte:</li> <li>- Tratar e monitorizar proteinúria quando rácio UPC &gt; 0,5 nos cães azotémicos</li> <li>- Controlar a hiperfosfatémia com restrição de fósforo na dieta e quelantes intestinais de fósforo (manter níveis de fósforo entre 2,7-4,5 mg/dL)</li> <li>- Controlar a acidose metabólica (manter valores de bicarbonato sanguíneo/CO<sub>2</sub> total entre 18-24 mmol/L)</li> </ul>
III Azotémia Renal Moderada	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Todos os itens indicados nos estádios I e II e o seguinte:</li> <li>- Controlar a hiperfosfatémia (manter níveis de fósforo &lt; 5 mg/dL)</li> <li>- Tratar a anemia se hematócrito &lt; 20%</li> <li>- Controlar anorexia/vómito/náuseas</li> <li>- Fornecer fluidos por via parenteral</li> </ul>
IV Azotémia Renal Grave	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Todos os itens indicados nos estádios I, II e III e o seguinte:</li> <li>- Controlar a hiperfosfatémia (manter níveis de fósforo &lt; 6 mg/dL)</li> <li>- Ponderar colocação de tubo de alimentação para impedir desnutrição/desidratação</li> <li>- Considerar diálise e/ou transplante renal; considerar eutanásia</li> </ul>

### **7.2.2. Tratamento das lesões dermatológicas**

Nos cães que apresentam piodermite secundária à Leishmaniose, está recomendada a utilização de antibioterapia de largo espectro de acção, durante 10 a 15 dias (antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, na dose de 20-30 mg/Kg, via oral, cada 12 horas ou amoxicilina em combinação com o ácido clavulânico, na dose 12,5 mg/Kg, via oral, cada 12 horas). No caso do tratamento etiológico incluir a aminosidina não é necessário adicionar outro antibiótico. Por outro lado, na presença de doenças concomitantes, como a Sarna Sarcóptica, Demodecose ou Dermatofitose, está indicada a administração de ivermectina ou de imidazóis (Ciaramella & Corona, 2003).

### **7.2.3. Tratamento das lesões oftalmológicas**

Nos casos em que existe inflamação intra-ocular, a prioridade é controlar rapidamente essa resposta inflamatória, devendo ser aplicada uma terapêutica efectiva para a uveíte, antes de ocorrer a formação de sinéquias e glaucoma. Alguns autores aconselham a utilização tópica de glucocorticóides ou anti-inflamatórios não esteróides em associação com fármacos de efeito cicloplégico e midriático, como a atropina em colírio, para controlar a uveíte anterior. Por outro lado, o tratamento de uveíte posterior exige a administração sistémica de corticosteróides, como a prednisolona (em doses reduzidas) ou anti-inflamatórios não esteróides, como o ácido tolfenâmico (4 mg/Kg, em dias alternados, por um longo período de tempo, por vezes vários meses). Se houver infecção bacteriana nos tecidos ou anexos oculares deve ser aplicada antibioterapia adequada, tópica ou sistemicamente (Roze, 2005; Komnenou & Koutinas, 2007).

## **8. PROGNÓSTICO**

O objectivo da terapêutica é eliminar o protozoário e curar definitivamente o animal. Contudo, a cura parasitológica é raramente alcançada e os cães tratados, mesmo quando sujeitos a administração prolongada de alopurinol, continuam portadores de *Leishmania* e a serem infectantes para os flebótomos, embora em menor grau (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

O prognóstico da Leishmaniose canina é difícil de estabelecer e depende do quadro clinicopatológico do paciente, da resposta imunitária individual e da progressão da doença. O sistema de estadiamento clínico para a Leishmaniose canina, proposto pelo grupo LeishVet, reúne as características clínicas e laboratoriais de cada animal doente e atribui um possível prognóstico (Baneth, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Deste modo, no estadio I (doença

ligeira) o prognóstico é bom, no estadio II (doença moderada) é bom a reservado, o estadio III (doença grave) apresenta reservado a mau prognóstico, enquanto ao estadio IV (doença muito grave) é atribuído um mau prognóstico (Miró *et al.*, 2010). Os animais que possuem compromisso da função renal são geralmente os com pior prognóstico (Noli *et al.*, 2006).

## 9. CONTROLO E PROFILAXIA

O controlo da Leishmaniose canina está intimamente relacionado com o controlo da Leishmaniose humana, visto que os canídeos são o principal hospedeiro reservatório de *L. infantum*. O controlo desta doença implica o desenvolvimento de medidas contra os insectos vectores e os hospedeiros reservatórios e medidas de protecção dos hospedeiros vertebrados (Campillo *et al.*, 1999).

Em alguns países do Mundo, nomeadamente na América do Sul e na China, existem **programas de eliminação dos cães** que apresentam teste serológico de IFI positivo, mas esta medida é comprovadamente insuficiente. De facto, a eliminação dos animais sintomáticos, nas zonas endémicas, não tem o impacto necessário devido à elevada taxa de cães assintomáticos e de canídeos silváticos infectados, que podem ser infectantes para o vector, e de animais abandonados, que dificilmente serão abrangidos pelo programa. Por outro lado, além da testagem serológica sistemática ser economicamente incomportável, este tipo de programa não é aceitável em países onde o cão é considerado um membro da família (Roze, 2005; Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008). Como alternativa, na maioria dos casos, realiza-se o estabelecimento imediato da terapêutica e a aplicação tópica de insecticidas repelentes, de forma a eliminar ou reduzir a capacidade infectante do cão (Campillo *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

As **medidas aplicadas contra os vectores biológicos** de *Leishmania* pretendem diminuir a população de flebótomos adultos. Entre elas destaca-se a pulverização de insecticidas de acção residual, como o lindano, nos locais onde os insectos permanecem em repouso, especialmente em localizações peridomésticas ricas em vegetação (por exemplo vivendas e alojamentos dos animais). A instalação de armadilhas electrocutoras, com lâmpadas ultravioleta para atrair os flebótomos, no exterior das habitações e canis é considerada um bom meio de controlo. Outra alternativa consiste na desflorestação e posterior reflorestação com espécies vegetais desfavoráveis ao desenvolvimento dos flebótomos, como as buganvílias, o rícino ou o limonete (Campillo *et al.*, 1999; Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008). Podem ainda utilizar-se redes mosquiteiras ou cortinas, pulverizadas com insecticidas

residuais, nas janelas e portas das habitações, na tentativa de evitar a entrada dos vectores (Miró *et al.*, 2008).

A **prevenção da picada do flebótomo** interrompe o ciclo de transmissão do protozoário e previne a ocorrência de infecção (Miró *et al.*, 2008). O método mais fácil de prevenção consiste em aconselhar os donos a manter os animais dentro de casa, sempre que possível, desde uma hora antes do anoitecer até uma hora após o amanhecer, durante a época de maior actividade dos vectores. A segunda medida profiláctica recomendada é a utilização de um insecticida repelente, eficaz contra os flebótomos, nos animais que vivam em zonas endémicas (Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008). Deste modo, não só o reservatório canino estará mais protegido de ser potencialmente infectado pela picada do insecto vector (acção repelente), como também os flebótomos, que eventualmente tenham contacto com o insecticida, podem morrer ou encurtar a sua longevidade. Estas medidas contribuem directamente para a diminuição da incidência da Leishmaniose canina, assim como conduzem à redução da densidade do vector e à diminuição da probabilidade de o Homem adquirir a doença (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Diversos compostos químicos demonstraram efeito repelente ou insecticida nestes vectores, porém com um nível de eficácia variável. Esta depende do modo de acção do composto, da sua capacidade de se distribuir e permanecer na pele e da susceptibilidade específica dos insectos. Os piretróides são os mais frequentemente utilizados devido à sua eficácia contra os flebótomos e baixa toxicidade para os canídeos. Deste modo, podem ser utilizadas coleiras impregnadas com deltametrina (Scalibor<sup>®</sup>), que têm efeito repelente e insecticida durante cerca de 6 meses e demonstram proteger os animais dos vectores *P. perniciosus* e *Lu. longipalpis*. A aplicação tópica de outros piretróides, sob a forma de *spot-on* ou *spray*, também apresenta eficácia contra os flebótomos, apesar de ter menor duração que as coleiras. Um *spray* constituído por permetrina e piriproxifeno (inibidor do crescimento do insecto) tem um efeito repelente imediato e protege durante cerca de 21 dias, enquanto um *spot-on* com associação de permetrina e imidaclopride apresenta actividade repelente 24 horas após aplicação, protegendo pelo menos durante 21 dias (Miró *et al.*, 2008; Baneth, 2006). Está descrito que a permetrina 65% (PulvEX Spot<sup>®</sup>) e a combinação de imidaclopride 10% com permetrina 50% (Advantix<sup>®</sup>), sob a forma de *spot-on*, apresentam uma acção repelente para os flebótomos e são eficazes na prevenção da Leishmaniose canina nas áreas endémicas (Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008; Bourdeau, 2009).

Por outro lado, nos cães provenientes de zonas livres de Leishmaniose, que se deslocam para áreas endémicas, é aconselhada a implementação de medidas profiláticas contra os flebótomos, algum tempo antes da viagem (Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008).

Nas zonas endémicas, seria desejável realizar uma **terapêutica sistémica profiláctica**, com fármacos anti-*Leishmania*, antes da actividade sazonal dos insectos vectores, mas é difícil persuadir os donos dos animais saudáveis a aceitar esta medida, não estando ainda provado o seu sucesso na prevenção da transmissão do parasita (Roze, 2005; Miró *et al.*, 2008).

A **imunoprofilaxia** seria uma forma de assegurar a protecção dos hospedeiros vertebrados e o controlo da doença, através da utilização de uma vacina eficaz contra a Leishmaniose canina, que fosse também estável, segura, pouco dispendiosa e conferisse um longo período de protecção. No entanto, a preparação de uma vacina exige a compreensão dos mecanismos de acção da componente imunológica celular e a identificação dos antígenos que condicionam a resposta imunitária protectora, não sendo por isso um processo fácil. Estudos realizados em modelos animais têm permitido compreender a imunopatogénese da infecção e a resposta dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> aos antígenos parasitários. Desta forma, a indução da protecção por uma vacina requer a estimulação de uma resposta imunitária celular estável (Th1), com activação de macrófagos e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e com manutenção de um conjunto de células de memória. Por outro lado, as moléculas antigénicas utilizadas na vacinação devem estimular a imunidade protectora, sem causar imunossupressão ou reacções imunopatológicas adversas (Roze, 2005; Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008).

Durante as últimas décadas vários investigadores, de diferentes laboratórios, procuraram induzir a imunidade protectora contra a Leishmaniose, utilizando uma extensa variedade de preparações antigénicas, como parasitas vivos atenuados, parasitas mortos, antígenos totais, fracções antigénicas, proteínas específicas, antígenos recombinantes ou sintéticos, antígenos de *Leishmania* produzidos por diferentes tipos de vectores de expressão e vacinas de ADN. Contudo, o sucesso de uma vacina não depende, única e exclusivamente, do produto vacinal (tipo de antígeno/vector de expressão), mas também do protocolo de vacinação utilizado, no qual devem ser considerados a dosagem, o número de doses, o intervalo entre as doses, a via de administração e o tipo de adjuvante (Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008). A escolha do adjuvante utilizado parece ser extremamente importante na vacinação contra a Leishmaniose canina, visto que esse composto participa, de forma activa, na estimulação e intensificação da resposta ao antígeno e no seu reconhecimento pelo sistema imunitário (Miró *et al.*, 2008).

Actualmente, várias vacinas contra a Leishmaniose canina estão sob avaliação experimental ou de campo, algumas com resultados promissores. As vacinas constituídas por fracções purificadas de *Leishmania* parecem ter maior sucesso e a principal representante deste grupo de antígenos vacinais é a fracção enriquecida da glicoproteína Gp63 de *L. donovani*, também conhecida como ligando fucose-manose (FML). Uma vacina constituída pelo antígeno FML

e pelo adjuvante saponina, foi avaliada através de diversos estudos realizados no Brasil, tendo revelado uma taxa de eficácia de cerca de 80%. Esta vacina, recentemente autorizada e licenciada naquele país, é a primeira comercializada contra a Leishmaniose canina (Leishmune<sup>®</sup>), tendo sido proposta também para o bloqueio da transmissão da infecção e como tratamento dos cães infectados. Desconhece-se se esta vacina terá impacto positivo na Saúde Pública e tem sido difícil diferenciar os animais naturalmente infectados dos cães vacinados, o que leva alguns Médicos Veterinários brasileiros a serem relutantes à sua utilização (Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008; Miró *et al.*, 2008). Uma segunda vacina baseada em fracções purificadas do protozoário foi alvo de estudos em França, nos quais demonstrou uma boa protecção contra a infecção experimental por *L. infantum* e uma elevada eficácia na prevenção da infecção natural. Neste caso, o produto vacinal utilizado é um antigénio de excreção-secreção purificado do sobrenadante do meio de cultura das formas promastigotas de *L. infantum* (LiESAp) e o adjuvante é uma saponina purificada (QA-21). Portugal foi o país eleito para o lançamento desta primeira vacina disponível na Europa (CaniLeish<sup>®</sup>), por apresentar uma elevada incidência da doença, tendo este ocorrido durante o primeiro semestre do corrente ano (Miró *et al.*, 2008).

## **10. IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA**

Aproximadamente 12 milhões de pessoas estão infectadas com Leishmaniose e cerca de 350 milhões estão em risco de adquirir esta doença, que é potencialmente fatal se não for estabelecido um tratamento (Baneth, 2006).

A transmissão de *L. infantum* dos cães ou canídeos selvagens para os humanos, através dos flebótomos, é considerada a principal via de infecção humana. No Sul da Europa, a Leishmaniose humana é geralmente esporádica e a relação entre o número de pessoas clinicamente afectadas e de cães infectados é reduzida, ou seja a posse de canídeos portadores do parasita não é considerada um factor de risco para a infecção do Homem. Por outro lado, um estudo realizado no Irão, onde a doença é mais frequente nas áreas rurais, demonstrou que a seropositividade nas crianças estava directamente relacionada com a densidade de canídeos na povoação, considerando-se nesse caso a proximidade entre o cão infectado e o seu proprietário um importante factor de risco (Miró *et al.*, 2008). Deste modo, é possível compreender que a ligação entre a infecção do canídeo e do Homem difere de região para região, e depende de vários factores, como a nutrição humana (a desnutrição é um factor predisponente), a capacidade imunitária (as crianças e os adultos com VIH/SIDA ou sujeitos a medicação citostática e imunossupressiva são os principais afectados), a densidade de canídeos na população e o comportamento dos insectos vectores (Baneth, 2006).

O Médico Veterinário deve transmitir informação sobre esta doença zoonótica aos donos dos seus pacientes, incentivar as medidas de controlo dos vectores e dos reservatórios e participar na prevenção e tratamento da Leishmaniose (Miró *et al.*, 2008).

### III. ESTUDO RETROSPECTIVO DOS CÃES COM LEISHMANIOSE OBSERVADOS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR NA CLÍNICA VET APAAC

---

#### 1. OBJECTIVOS

Este estudo teve como objectivo caracterizar a amostra de cães diagnosticados com Leishmaniose, de acordo com o sexo, idade, raça, local de habitação, profilaxia, sintomatologia e resultados dos exames complementares realizados. Pretendeu-se também determinar a frequência de IRC nos canídeos incluídos na amostra, aplicando ainda os conhecimentos adquiridos sobre o sistema de estadiamento e sub-estadiamento de IRC canina, proposto pela IRIS.

#### 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido durante o estágio curricular realizado na clínica VET APAAC, entre 6 de Setembro de 2010 e 5 de Fevereiro de 2011. Durante este período foram observados 19 cães com Leishmaniose, cujo diagnóstico foi realizado com base na anamnese, exame físico, análises laboratoriais e teste de diagnóstico serológico qualitativo, baseado na técnica de imunocromatografia rápida (WITNESS<sup>®</sup> *Leishmania* ou Speed<sup>®</sup> Leish). Em alguns casos foram integrados também os resultados do proteinograma, do rácio UPC e da técnica serológica de IFI, obtidos num laboratório certificado (DNAtech). No método de IFI, o limiar de positividade foi 1/160, tendo sido utilizadas ainda as titulações 1/80, 1/240 e 1/320, considerando-se como suspeitos de Leishmaniose os animais que apresentavam apenas a titulação 1/80 positiva. Nos cães com alterações físicas e/ou laboratoriais compatíveis com IRC, foi ainda estabelecido o estadio e sub-estadio da doença renal, como é proposto pela IRIS, ou seja de acordo com as concentrações plasmáticas de creatinina e o grau de proteinúria, respectivamente. Porém, nestes animais não foi avaliada a pressão arterial sistémica, o que não permitiu o sub-estadiamento da doença renal com base nesse parâmetro.

Por ser um estudo retrospectivo, nem sempre foi possível acompanhar pessoalmente todos os casos clínicos, tendo havido por isso recurso a um sistema de gestão de base de dados (WinVet<sup>®</sup>), onde está contida toda a informação relativa a cada paciente, desde as fichas clínicas aos resultados dos exames complementares de diagnóstico efectuados naquela clínica. Depois de recolhida toda a informação, procedeu-se à análise dos dados, com base em métodos de estatística descritiva (média, moda, mediana, desvio padrão, máximo, mínimo, frequência absoluta e relativa), utilizando o programa informático Microsoft<sup>®</sup> Office Excel 2007, permitindo assim a construção de tabelas e gráficos que reúnem os resultados.

## **2.1. Limitações do estudo**

O estudo retrospectivo foi efectuado numa população de 19 canídeos, uma amostra relativamente reduzida, da qual não é possível retirar conclusões absolutas sobre a prevalência da população total, permitindo apenas obter algumas ilações válidas para esta amostra. Por outro lado, na avaliação dos resultados deste estudo é necessário ter em conta alguns aspectos, nomeadamente as limitações económicas e a disponibilidade dos proprietários dos animais. Devido à duração do estágio, não foi possível acompanhar todos os casos pessoalmente, o que se tornou também um factor limitativo em termos de uniformização do estudo. Idealmente, deveriam ter sido realizados os mesmos exames complementares de diagnóstico em todos os animais, incluindo a medição da pressão arterial sistémica e a avaliação da função renal, através das concentrações plasmáticas de creatinina e ureia, da urianálise e do rácio UPC, para que houvesse maior fiabilidade na comparação entre os casos clínicos. Teria sido interessante acompanhar a evolução e a resposta ao tratamento destes pacientes e avaliar as alterações no estadiamento e sub-estadiamento dos animais com IRC. Além disso, este estudo teve como únicas fontes de dados as fichas clínicas e a informação recolhida pela autora no decorrer das consultas. Todos estes factores concorrem, de uma forma ou de outra, para que o estudo realizado tenha várias limitações e para que os resultados obtidos possam não estar de acordo com a informação apresentada na revisão bibliográfica, citada anteriormente.

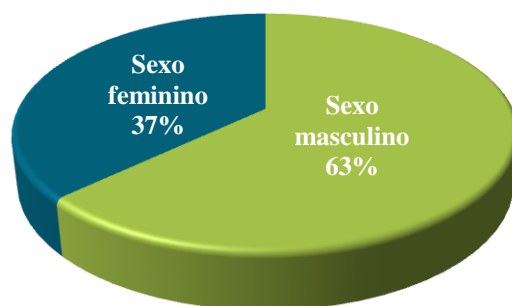
## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Caracterização da amostra**

Foram registados os seguintes dados dos 19 cães constituintes da amostra: sexo, idade, raça, área de proveniência, habitat (exterior, interior ou misto) e medidas de prevenção aplicadas contra a picada do insecto vector (Anexo 5).

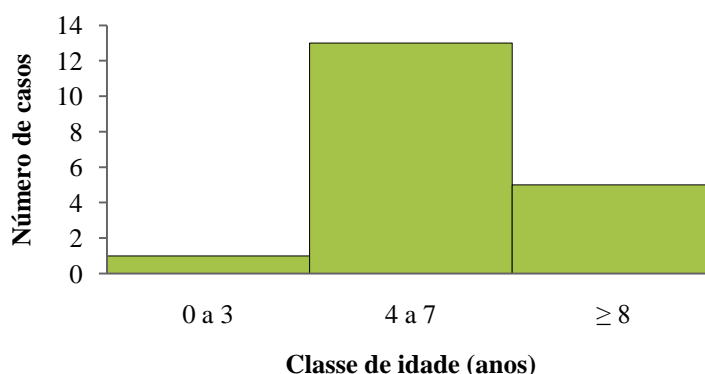
Verificou-se que da população em estudo, 63% (12/19 animais) eram do sexo masculino e 37% (7/19 animais) do sexo feminino (Gráfico 2).

**Gráfico 2** – Frequência relativa do sexo dos canídeos da amostra



A idade dos animais estava compreendida entre os 3 anos e os 10 anos, sendo a média de  $6 \pm 1,9$  anos. A mediana e a moda tiveram o mesmo valor, ou seja 5 anos. A distribuição dos cães da amostra por classes de idade (Gráfico 3) demonstra que a maioria tinha idade compreendida entre os 4 e os 7 anos ( $n=13$ , ou seja 68%), cinco cães (26%) apresentavam idade igual ou superior a 8 anos e apenas um animal tinha menos de 4 anos.

**Gráfico 3** – Histograma de distribuição dos canídeos da amostra por classes etárias



Quanto à prevalência das raças (Tabela 9), constatou-se que do total da população, 73% (14/19 animais) eram de raça pura, 16% (3/19 animais) eram de raça indeterminada e cerca de 11% (2/19 animais) eram resultantes de cruzamentos entre raças diferentes. As raças observadas com maior frequência foram o Retriever do Labrador (22%, que corresponde a 4/19) e o Pastor Alemão (16%, que corresponde a 3/19). As raças nacionais, representadas pelo Podengo Português Grande e Cão da Serra da Estrela, constituíram 11% da amostra estudada (2/19 animais).

**Tabela 9** – Frequência absoluta e relativa das raças dos canídeos da amostra

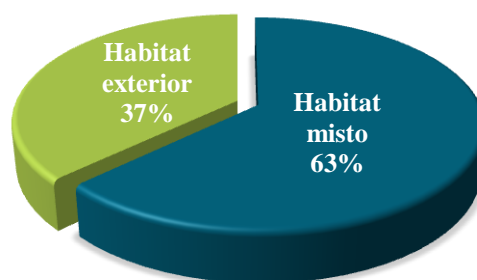
Raça	Nº de casos (%)
Retriever do Labrador	4 (22)
Pastor Alemão	3 (16)
Braco Alemão	1 (5)
Cão da Serra da Estrela	1 (5)
Husky Siberiano	1 (5)
Podengo Português Grande	1 (5)
Pointer	1 (5)
Setter	1 (5)
Teckel	1 (5)
Indeterminada	3 (16)
Cruzamentos	2 (11)
<b>Total</b>	<b>19 (100)</b>

Foi definida também a proveniência e o tipo de habitat de cada animal em estudo, visto que estes factores influenciam a probabilidade de infecção por *Leishmania*.

No que diz respeito à área de proveniência, verificou-se que a maioria dos cães pertencia ao concelho do Cartaxo, isto é cerca de 79% (15/19 animais), enquanto os restantes provinham do concelho de Azambuja (11%, que corresponde a 2/19) e do concelho de Santarém (5%, que corresponde a 1/19). De salientar ainda a observação de um animal proveniente das Caldas da Rainha, distrito de Leiria.

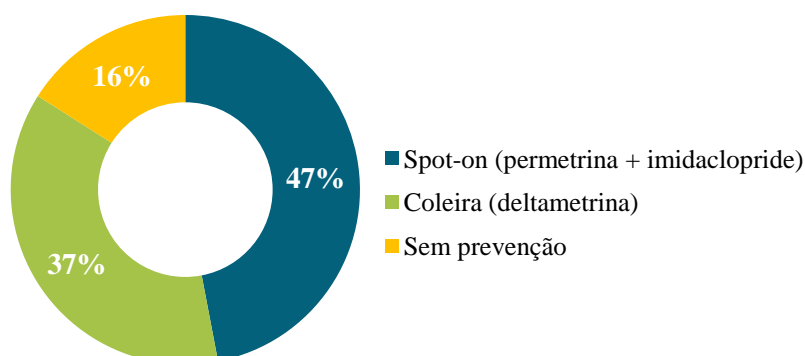
Por outro lado, neste estudo foram definidos três tipos de habitat: permanência exclusivamente no exterior, permanência no interior da habitação com acesso ao exterior, também designado como habitat misto, e permanência exclusivamente no interior de uma residência. Foi possível determinar que todos os animais da população passavam grande parte do tempo ao ar livre, quer tendo a possibilidade de estarem dentro e fora de casa (63%, ou seja 12/19), quer vivendo exclusivamente no exterior (37%, ou seja 7/19), não havendo nenhum canídeo na amostra com habitat exclusivamente interior (Gráfico 4).

**Gráfico 4** – Frequência relativa do tipo de habitat dos canídeos da amostra



Quanto às medidas de prevenção contra a infecção por *L. infantum*, como se pode verificar pelo Gráfico 5, em 47% (9/19) dos cães da amostra eram aplicados *spot-on*, constituídos por permetrina e imidaclopride (Advantix<sup>®</sup>), enquanto em 37% (7/19 animais) eram utilizadas coleiras impregnadas com deltametrina (Scalibor<sup>®</sup>). Apenas três canídeos (16%) da população estudada não recebiam qualquer tipo de medida profilática.

**Gráfico 5** – Frequência relativa do tipo de prevenção contra a picada do insecto vector realizada nos canídeos da amostra



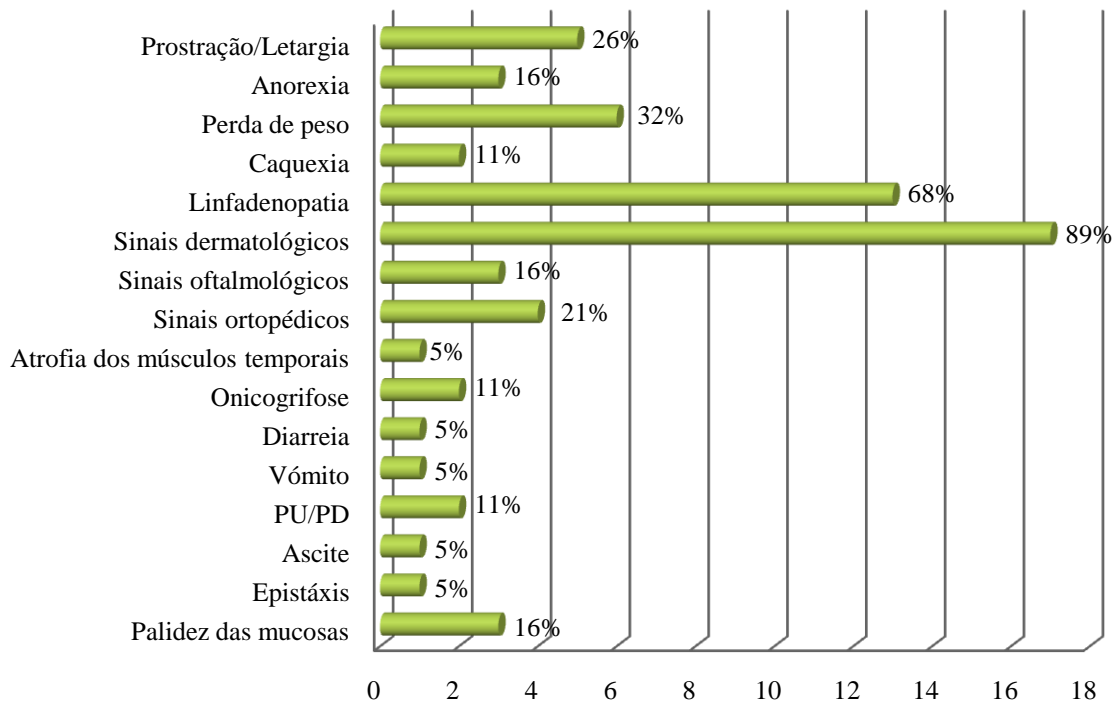
### 3.2. Sinais clínicos

Nos 19 animais diagnosticados com Leishmaniose canina, foi possível observar uma grande diversidade de sinais clínicos, consequentes da própria doença ou resultantes de doenças concomitantes. A sintomatologia de cada canídeo da amostra está descrita no Anexo 6 e expressa pela sua frequência no Gráfico 6.

Considerando a amostra em estudo, 26% (5/19) dos animais apresentaram-se à consulta prostrados ou letárgicos, 16% (3/19 animais) tinham perda de apetite (anorexia) e 32% (6/19 animais) exibiam perda de peso progressiva ou acentuada. Verificou-se que o aumento do tamanho dos linfonodos era um sinal clínico comum desta doença, estando presente em 13/19

canídeos (68%). Desta fracção populacional, 24% (3/13) apresentavam linfadenopatia dos poplíteos e sub-mandibulares, 38% (5/13) tinham aumento apenas dos linfonodos poplíteos e a mesma frequência relativa (38%, ou seja 5/13) foi verificada para a linfadenopatia generalizada.

**Gráfico 6** – Frequência absoluta e relativa dos sinais clínicos dos canídeos da amostra



Verificou-se que os sinais dermatológicos eram bastante frequentes na população em estudo, estando presentes em 17/19 canídeos (89%). Destes 17 animais, 9 (53%) apresentavam seborreia seca, 9 (53%) manifestavam alopecia peri-ocular, no focinho, pavilhões auriculares, flancos, abdómen e/ou cauda, e 7 (41%) evidenciavam lesões cutâneas localizadas em zonas específicas, nomeadamente lesões ulcerativas nos membros, pavilhões auriculares e/ou abdómen. Outras alterações cutâneas foram identificadas, porém com menor frequência, como a dermatite interdigital (6%, ou seja 1/17) e a hiperqueratose do focinho (6%, ou seja 1/17). A onicogribose estava presente em 2/19 animais (11%).

Por outro lado, apenas 3 cães da amostra (16%) manifestavam alterações oftalmológicas. Assim, um dos animais apresentava conjuntivite bilateral e úlcera perfurante da córnea do olho direito, com neovascularização, noutra canídeo foram detectados nódulos na zona palpebral e úlcera da córnea do olho esquerdo e no terceiro animal estava presente uveíte anterior bilateral.

Adicionalmente, constatou-se que 21% (4/19) dos cães demonstravam sintomatologia ortopédica, nomeadamente claudicação (em três dos quatro animais) e manifestação de dor

durante a manipulação dos membros (em um animal). Contudo, a realização de exames radiográficos permitiu revelar a presença de artroses em dois desses quatro canídeos, podendo justificar a dor e claudicação por eles demonstradas.

Foram poucos os animais que apresentaram sintomatologia gastrointestinal (11%, ou seja 2/19), como diarreia e vômito.

Refere-se ainda a ocorrência de ascite, poliúria/polidipsia (PU/PD) e palidez das mucosas em 5% (1/19), 11% (2/19) e 16% (3/19) da população de canídeos estudada, respectivamente.

### 3.3. Exames complementares

No seguimento da avaliação clínica dos canídeos, foram realizados diversos exames complementares de diagnóstico com o objectivo de identificar as eventuais alterações hematológicas, renais e hepáticas, que pudessem auxiliar no diagnóstico da Leishmaniose canina. Infelizmente, por motivos de contenção de custos pelos proprietários ou por não comparecimento após a primeira consulta, nem sempre foram efectuadas as análises laboratoriais necessárias para a correcta abordagem e monitorização desta doença.

Deste modo, apenas foi possível estudar os **hemogramas** realizados a 16 animais da população total, cujos resultados estão apresentados no Anexo 7. Através da Tabela 10, podem verificar-se as alterações hematológicas detectadas com maior frequência.

**Tabela 10** – Resultados do hemograma de 16 animais e o seu respectivo estudo estatístico

Parâmetros (intervalo de referência <sup>1</sup> )	Média	Mediana	Desvio Padrão	Máximo	Mínimo	FR (%) ↑	FR (%) ↓
Eritrócitos (5,5-8,5 x10 <sup>6</sup> /μL)	5,53	5,91	1,5	7,35	2,52	0	38
Hematócrito (37-55%)	37,12	39,80	9,47	50,30	18,15	0	38
Hemoglobina (12-18 g/dL)	12,41	13,70	3,44	16,20	5	0	38
VCM (60-77 fL)	67,34	67	4,39	76	61,4	0	0
HCM (19,5-24,5 pg)	22,78	22,7	1,26	25,7	20,5	6	0
CHCM (31-36 g/dL)	32,99	33,25	1,16	34,8	29,9	0	6
Plaquetas (200-500 x10 <sup>3</sup> /μL)	213,38	236,5	113,33	398	13	0	38
Leucócitos (6-17 x10 <sup>3</sup> /μL)	9,25	8,85	3,29	15,14	4,77	0	19
Neutrófilos (3,0-11,8 x10 <sup>3</sup> /μL)	6,75	6,11	2,83	11,39	3,49	0	0
Linfócitos (1,0-4,8 x10 <sup>3</sup> /μL)	1,59	1,3	0,56	2,5	0,86	0	13
Monócitos (0,2-2,0 x10 <sup>3</sup> /μL)	0,51	0,42	0,36	1,4	0,18	0	6
Eosinófilos (0,1-1,3 x10 <sup>3</sup> /μL)	0,33	0,18	0,34	1,14	0	0	19
Basófilos (0-0,5 x10 <sup>3</sup> /μL)	0,11	0,11	0,12	0,4	0	0	0

Legenda: (<sup>1</sup> De acordo com o laboratório certificado DNAtch); FR(%)↑, frequência relativa dos animais com parâmetro aumentado; FR(%)↓, frequência relativa dos animais com parâmetro diminuído; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média.

Verificou-se que cerca de 38% (6/16) dos animais apresentavam valores de plaquetas abaixo do intervalo de referência, porém em 3 destes 6 canídeos existia agregação plaquetária, não tendo sido considerada a presença de trombocitopenia. Por outro lado, constatou-se uma diminuição dos valores de hematócrito, eritrócitos e hemoglobina em 6 animais (38%) desta fracção populacional estudada. Além da anemia normocítica e normocrômica e da trombocitopenia, foram também identificadas leucopenia (19%, ou seja 3/16 animais), linfopenia (13%, ou seja 2/16 animais) e eosinopenia (19%, ou seja 3/16 animais).

No que diz respeito às **análises bioquímicas**, os seus resultados estão registados no Anexo 8 e as principais alterações detectadas nos canídeos estão referidas na Tabela 11. A ureia e a creatinina plasmáticas foram os parâmetros bioquímicos avaliados numa parte mais significativa da amostra (18/19 canídeos), visto que a IRC é uma complicação frequente da Leishmaniose canina, sendo fundamental avaliar a função renal antes da instituição da terapêutica. Contudo, dos 18 animais onde estes parâmetros foram avaliados, apenas 4 (22%) demonstraram ter um aumento da ureia e creatinina séricas. Por outro lado, é importante salientar a ocorrência de hiperproteinemia em 6/8 canídeos (75%), de hipoalbuminemia em 2/7 canídeos (29%) e de hiperglobulinemia em 4/6 canídeos (67%). Apenas num animal (13%, ou seja 1/8) existia hipoproteinemia, associada à diminuição da concentração plasmática de albumina. Os níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e FAS também foram determinados, estando aumentados em 7% (1/14) e 13% (2/15) dos animais, respectivamente.

**Tabela 11** – Alterações dos parâmetros bioquímicos dos canídeos com Leishmaniose

Parâmetros bioquímicos	n/t (FR%)	Parâmetros bioquímicos	n/t (FR%)
Aumento da creatinina	4/18 (22%)	Hiperproteinemia	6/8 (75%)
Aumento da ureia	4/18 (22%)	Hipoproteinemia	1/8 (13%)
Aumento da ALT	1/14 (7%)	Hipoalbuminemia	2/7 (29%)
Aumento da FAS	2/15 (13%)	Hiperglobulinemia	4/6 (67%)

Legenda: ALT, alanina aminotransferase; FAS, fosfatase alcalina sérica; n/t (%), número de casos com o parâmetro alterado, no total de animais onde essa análise foi efectuada; FR%, frequência relativa associada.

Adicionalmente, foi efectuada a **urianálise** (tira reactiva urinária Multistix<sup>®</sup>) em 6 animais, representando apenas 32% da população total. A realização desta análise teve em conta diversos motivos e objectivos. Em 3 canídeos, foi efectuada por apresentarem níveis séricos elevados de ureia e creatinina, enquanto noutros 2 animais o principal objectivo foi monitorizar a proteinúria. No sexto canídeo, a urianálise foi requisitada por este apresentar

simultaneamente PU/PD, aumento dos parâmetros bioquímicos renais, hipoalbuminémia e ascite, pretendendo-se averiguar a presença de perda proteica pela urina. Apenas num animal (17%, ou seja 1/6) foi detectada hematuria (3+ na tira reactiva de urina), sendo a proteinúria a alteração mais frequente. Esta estava presente em todos os animais onde foi realizado o exame urinário (100%), variando a concentração de proteína entre os 30 mg/dL e os 300 mg/dL (1+ a 3+ na tira reactiva de urina). No entanto, nos 4 animais onde os níveis plasmáticos de ureia e creatinina estavam elevados, além da urianálise, foi realizada a determinação do rácio proteína/creatinina urinário (rácio UPC), que permite quantificar a concentração das proteínas na urina, auxiliando na avaliação da gravidade das lesões renais e da progressão da IRC. Os resultados do rácio UPC obtidos estão apresentados na Tabela 12, sendo importante ter em conta que valores iguais ou superiores a 0,5 são indicativos de proteinúria.

**Tabela 12** – Resultados do rácio proteína/creatinina urinário de 4 canídeos com Leishmaniose

Animal	Rácio UPC	Nível urinário de proteína (mg/dL)	Nível urinário de creatinina (mg/dL)
4	0,4	48,04	118,2
12	17,2	802,63	46,7
16	0,8	46	58,88
18	0,3	19	57,7

Por outro lado, foi realizado o estadiamento da IRC nesses 4 canídeos, através da concentração plasmática de creatinina, como é proposto pela IRIS. Nos animais em que se obteve mais do que uma colheita sanguínea para análise, utilizou-se o valor médio das diferentes determinações, porém nos casos onde isso não foi possível, houve a necessidade de recorrer ao valor de creatinina apresentado na primeira consulta. Verificou-se que 50% (2/4) dos canídeos se encontravam no estadio II (creatinina plasmática entre 1,4-2,0 mg/dL), por apresentarem valores de 1,8 mg/dL e 1,9 mg/dL, enquanto os restantes 50% (2/4) estavam no estadio III (creatinina plasmática entre 2,1-5,0 mg/dL), visto terem concentrações séricas de creatinina de 2,1 mg/dL e 4,1 mg/dL.

Nesses quatro canídeos, foi efectuado ainda o sub-estadiamento da IRC, porém apenas com base na proteinúria, uma vez que não foi determinada a pressão arterial sistémica. Deste modo, os animais eram classificados como não proteinúricos se não houvesse detecção de proteína através da tira reactiva de urina, como proteinúricos no limite quando o rácio UPC se encontrava entre 0,2 e 0,5, e como proteinúricos quando esse rácio era superior a 0,5. Assim foi possível constatar que os dois canídeos com estadio II de IRC eram proteinúricos no limite, tendo valores de rácio UPC de 0,4 e 0,3, enquanto que os rácios obtidos (0,8 e 17,2)

nos dois animais com estadió III de doença renal, permitiram classificá-los como proteinúricos. De salientar que no cão com estadió III de IRC e rácio UPC igual a 17,2, estavam presentes sinais clínicos e outras alterações laboratoriais consistentes com síndrome nefrótico, nomeadamente hipoalbuminémia e ascite.

Os **exames radiográficos** foram realizados a 26% (5/19) dos canídeos da amostra. Num dos animais com Leishmaniose, a radiografia ao tórax tinha como finalidade averiguar a presença de metástases pulmonares, aquando do aparecimento de neoplasias mamárias. Realizaram-se também exames radiográficos aos membros anteriores e posteriores, nos quatro canídeos que manifestavam claudicação e dor durante a manipulação ortopédica, sendo que em 2 deles foi possível detectar a presença de artroses, enquanto nos restantes não se identificaram as causas.

A **ultrassonografia abdominal** foi realizada em 2 animais (11%) da população total. Numa cadela existia suspeita de piómetra fechada, que se confirmou ecograficamente. No canídeo onde estava presente ascite, procedeu-se a uma abdominocentese ecoguiada, com posterior caracterização do líquido ascítico, que revelou ser um transudado, com reduzido número de leucócitos e eritrócitos, baixa concentração proteica e densidade igual a 1.015.

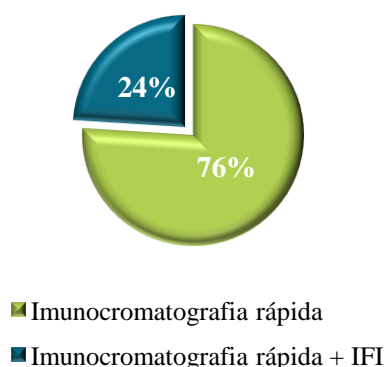
### **3.4. Diagnóstico etiológico**

Dos 19 canídeos da amostra, 11% (2/19) compareceram à consulta com o diagnóstico de Leishmaniose efectuado noutra clínica, enquanto nos restantes 89% (17/19) esta doença foi diagnosticada em alturas distintas na clínica VET APAAC. Desta fracção populacional, 11 canídeos (65%, ou seja 11/17) foram diagnosticados com Leishmaniose durante o estágio curricular e os restantes 6 animais (35%) compareceram à consulta para controlo da doença em questão, devido a doenças concomitantes ou apenas para vacinação/desparasitação.

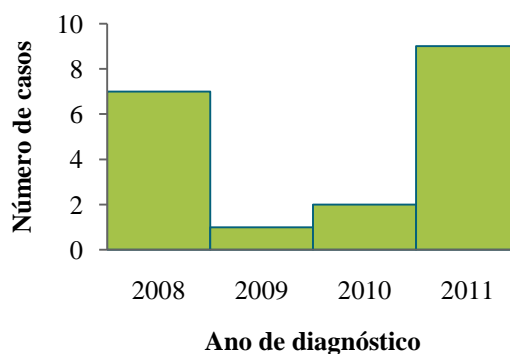
A pesquisa do agente etiológico foi efectuada através de pelo menos um método serológico, nomeadamente pela técnica de imunocromatografia rápida e/ou pela técnica de IFI (Gráfico 7). Deste modo, em 13 animais (76%, ou seja 13/17) foi utilizada exclusivamente a imunocromatografia rápida e nos outros 4 canídeos (24%) associou-se esta técnica serológica qualitativa ao método de IFI. Assim, através da imunofluorescência indirecta foi possível constatar que dois animais apresentavam títulos de anticorpos acima do limite superior ( $>1/320$ ), que um cão era positivo para a titulação 1/160 e outro para a titulação 1/320. De salientar que a técnica de IFI foi realizada em três canídeos, alguns meses após o início da terapêutica, com o objectivo de reavaliar os títulos de anticorpos anti-*Leishmania*. Verificou-se que num dos animais havia um resultado negativo, com a indicação de fluorescência basal, e nos outros dois apenas permanecia positiva a titulação 1/80.

Tendo em conta o Anexo 9 e observando o Gráfico 8, no que diz respeito ao ano de diagnóstico da Leishmaniose, verifica-se que em 2010 foram diagnosticados 2/19 cães (11%), enquanto em 2011, até ao mês de Fevereiro, foram identificados 9/19 animais com esta doença, ou seja com uma frequência relativa de cerca de 47%. Os animais diagnosticados nos anos 2008 (37%, ou seja 7/19) e 2009 (5%, ou seja 1/19), compareceram à consulta na clínica para controlo da Leishmaniose, pela ocorrência de recidivas desta doença ou pelo desenvolvimento de doenças concomitantes, entre outros motivos.

**Gráfico 7** – Frequência relativa do método de diagnóstico utilizado nos canídeos da amostra



**Gráfico 8** – Distribuição dos canídeos da amostra segundo o ano de diagnóstico



### 3.5. Diagnóstico de doenças concomitantes

No que diz respeito às doenças concomitantes, apenas 6 animais (32%) da população total apresentaram outros tipos de patologia, como se pode verificar no Anexo 9 e na Tabela 13. É importante referir que no mesmo animal pôde ser detectada, em momentos clínicos diferentes, mais do que uma doença concomitante com a Leishmaniose canina.

**Tabela 13** – Doenças concomitantes presentes nos 6 canídeos com Leishmaniose

Doença concomitante	n	Doença concomitante	n
Dirofilariose	1	Piómetra	1
Erliquiose	1	Pseudogestação	1
Traqueobronquite Infecciosa	1	Mamite	1
Glossite	1	Neoplasias Mamárias	1

### 3.6. Tratamento etiológico e sintomático

O Anexo 10 inclui toda a informação recolhida sobre a terapêutica etiológica instituída, bem como a posologia e duração do tratamento.

Em todos os canídeos (100%) que integraram a amostra, foi administrada a terapêutica etiológica. Verificou-se que 53% (10/19) dos animais recebeu tratamento combinado entre diferentes fármacos, enquanto nos restantes 9/19 canídeos (47%) utilizou-se alopurinol em monoterapia. As combinações medicamentosas incluíram a associação do tratamento leishmaniosstático (Zyloric<sup>®</sup>) com um fármaco leishmanicida, nomeadamente o antimoniato de glucamina (Glucantime<sup>®</sup>), em 9/19 (47%) dos animais, ou a miltefosina (Milteforan<sup>®</sup>), utilizada apenas num canídeo (5%).

No que diz respeito à dose de alopurinol administrada, esta variou entre 20 e 30 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, sendo instituída indefinidamente. No caso do antimoniato de glucamina, a dose considerada foi de 100 mg/Kg, uma vez ao dia, por via subcutânea, numa série de 10 injeções, realizadas em dias alternados, sendo repetido o ciclo de tratamento após uma semana de intervalo, durante a qual era feita a reavaliação do animal. Para a miltefosina a dose utilizada foi 2 mg/Kg, por via oral (de preferência juntamente com a dieta), a cada 24 horas, durante 28 dias.

Em dois animais houve a necessidade de instituir terapêutica direccionada a outras parasitoses, concomitantes com a Leishmaniose canina. Deste modo, no canídeo diagnosticado com Dirofilariose foram administradas duas injeções de melarsomina (Immiticide<sup>®</sup>, na dose de 2,5 mg/Kg) e de acetato de prednisolona (Hostacortina<sup>®</sup>, na dose de 1 mg/Kg), por via intramuscular, com um intervalo de 24 horas. Seis semanas após a terapêutica adulticida, foi instituído o tratamento microfilaricida com ivermectina (Ivomec<sup>®</sup>, na dose de 0,5 mg/Kg), numa única administração por via subcutânea. O ácido acetilsalicílico (Aspirina<sup>®</sup>, na dose de 5 mg/Kg/dia, via oral) foi também utilizado no período compreendido entre 15 dias antes do início da terapêutica e um mês após o final da mesma. No caso clínico em que existia Erliquiose e Leishmaniose concomitantes, foi necessário sedar o animal no momento da apresentação clínica, de modo a facilitar o controlo da epistáxis, que foi conseguido utilizando adrenalina intranasal e ácido aminocapróico (Epsicaprom<sup>®</sup>, na dose de 15 mg/Kg, diluído, via endovenosa lenta). Posteriormente, foi instituída a terapêutica com doxiciclina (Actidox<sup>®</sup>), na dose de 10 mg/Kg, via oral (juntamente com a dieta), cada 24 horas, durante 30 dias.

Nos animais que apresentavam claudicação e/ou dor à manipulação ortopédica, foram administrados compostos anti-inflamatórios não esteróides, como o carprofeno (Rimadyl<sup>®</sup> ou

Canidryl<sup>®</sup>), na dose de 2-4 mg/Kg, via oral, cada 12 ou 24 horas, ou o meloxicam (Movalis<sup>®</sup> ou Metacam<sup>®</sup>), na dose de 0,1 mg/Kg, via oral, cada 24 horas, durante um período variável de tempo. Nestes animais foi também aconselhada a utilização de protectores articulares, como o Omnicondro<sup>®</sup>.

Na presença de sintomatologia oftalmológica foram administrados diferentes fármacos, sobretudo antibióticos e anti-inflamatórios. O principal antibiótico utilizado foi o cloranfenicol, quer sob a forma de colírio (Clorocil<sup>®</sup>), sendo aplicadas 2 gotas, duas vezes ao dia, quer sob a forma de pomada (Lacrybiotic<sup>®</sup>), aplicada a cada 12 horas. Esta pomada é constituída também por vitamina A, contribuindo assim para a cicatrização das lesões oculares. O Voltaren<sup>®</sup> colírio (diclofenac sódico) e a Frisolona Forte<sup>®</sup> colírio (acetato de prednisolona) foram os anti-inflamatórios mais utilizados, sendo administradas 1 a 2 gotas, duas a três vezes por dia. A duração desta terapêutica variou entre uma semana e vários meses, de acordo com a evolução clínica dos animais.

Para o tratamento das dermatites e lesões cutâneas ulcerativas, foi efectuada a limpeza e desinfecção diária das feridas, bem como a administração de antibióticos de largo espectro, nomeadamente amoxicilina em associação com o ácido clavulânico, na dose de 12,5 mg/Kg, via oral, cada 12 horas, com duração média entre 10 a 15 dias. Em alguns casos foi ainda sugerido o banho com solução de iodopovidona a 4% (Betadine<sup>®</sup> Espuma), pelo menos uma vez por semana, ou uma aplicação tópica diária de uma loção constituída por kanamicina e acetato de dexametasona (Calmoderme<sup>®</sup>).

Nos canídeos que apresentavam aumento das enzimas hepáticas (ALT e/ou FAS) foi instituída terapêutica hepatoprotectora, como o ácido ursodesoxicólico (Destolit<sup>®</sup>), na dose de 10 a 15 mg/Kg, por via oral, cada 24 horas, durante cerca de 30 dias.

Na presença de anemia, associada ou não a IRC, recomendou-se a utilização de gluconato ferroso (Hemototal<sup>®</sup>), por via oral, geralmente num total de 600 mg/dia, dividido em duas tomas. Nos animais com IRC, além desta medida terapêutica, foi aconselhada a alteração da dieta para uma ração renal e, quando as concentrações plasmáticas de creatinina e ureia se encontravam muito elevadas, o animal permanecia na clínica para receber fluidoterapia, até normalização desses parâmetros bioquímicos. No entanto, no canídeo com síndrome nefrótico, além do controlo da anemia, da alimentação e da IRC, foi necessário instituir um tratamento adequado à sua situação clínica. Deste modo, utilizou-se o ácido acetilsalicílico (Aspirina<sup>®</sup>, na dose de 0,5 mg/Kg/dia, via oral), um inibidor da enzima de conversão da angiotensina, nomeadamente o enalapril (na dose de 0,5 mg/Kg, via oral, cada 24 horas) e um diurético, como a furosemida, uma vez que existia ascite. Este fármaco foi administrado

inicialmente na dose de 2 mg/Kg, via oral, cada 12 horas, durante 7 dias, sendo posteriormente reduzida para metade (1 mg/Kg) e administrada durante mais uma semana. Constatou-se que, dos 19 animais, 9 (47%) responderam eficazmente à terapêutica instituída, uma vez que além da redução da sintomatologia, apresentavam parâmetros laboratoriais dentro dos valores de referência ou significativamente melhores, quando comparados com as análises realizadas antes do tratamento. Entre estes animais destacam-se dois canídeos, nos quais foi administrada terapêutica contra a *Dirofilariose* e *Erliquiose*, tendo esta sido igualmente bem sucedida. Deste modo, não foram detectadas microfilárias no exame directo do sangue periférico (gota a fresco) no animal com diagnóstico de *Dirofilariose*, e em ambos os canídeos foram obtidos resultados negativos nas técnicas de imunocromatografia rápida, para aquelas doenças. Por outro lado, 16% (3/19) da população total estudada, não respondeu adequadamente ao tratamento instituído. Num dos canídeos, a ocorrência de complicações da própria doença em associação com a sua idade avançada, levaram os proprietários a optarem pela eutanásia do animal. Noutro caso clínico, havia recorrências frequentes da sintomatologia dermatológica, tendo sido sugerida a combinação medicamentosa entre o alopurinol e o antimoniato de glucamina, mas o dono esteve sempre relutante quanto à utilização de Glucantime<sup>®</sup>. No terceiro canídeo, ocorreu lapso na administração dos fármacos por parte dos proprietários, nomeadamente da furosemida, o que não permitiu obter a resposta clínica esperada. Em relação aos restantes 7 animais (37%), não foi possível conhecer a evolução terapêutica, por não comparecimento na clínica após ser comunicado o tratamento a efectuar (4 canídeos), ou apenas por terem iniciado a terapêutica recentemente (3 canídeos).

#### **4. DISCUSSÃO**

O sexo masculino representa 63% da amostra estudada, estando de acordo com alguns estudos, que reportam uma maior predisposição para a *Leishmaniose* nos machos. Contudo, certos autores referem que, nas áreas endémicas, não existe diferenças na prevalência da infecção entre ambos os sexos (Rosypal *et al.*, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

No que diz respeito à idade, verificou-se que 68% (13/19) dos cães tinham entre 4 e 7 anos e 26% (5/19 animais) apresentava idade igual ou superior a 8 anos. Esta situação pode ser explicada pelo facto da *Leishmaniose* canina ser uma doença crónica, com um período de incubação considerado muito longo, podendo variar de 3 meses a 6 anos, até ocorrer o aparecimento dos primeiros sintomas (Roze, 2005). Deste modo, é possível que a infecção destes animais tenha ocorrido há algum tempo, permanecendo assintomáticos enquanto o seu sistema imunitário restringia o desenvolvimento do protozoário e permitia torná-los resistentes à doença. No entanto, a ocorrência de depleção da resposta imunológica e/ou o

aparecimento de doenças concomitantes, tornaram estes canídeos mais susceptíveis ao estabelecimento da Leishmaniose clínica. Por outro lado, os animais mais velhos têm maior probabilidade de serem infectados por *Leishmania*, uma vez que tiveram maior tempo de exposição ao insecto vector, que os animais jovens (Baneth *et al.*, 2008).

Adicionalmente, constatou-se que as raças Retriever do Labrador e Pastor Alemão foram as mais prevalentes neste estudo, com frequências relativas de 22% e 16%, respectivamente. De facto, diversos autores referem haver maior susceptibilidade para a doença em certas raças caninas, entre as quais se encontra o Pastor Alemão (Solano-Gallego & Baneth, 2008). Além disso, os cães de grande porte vivem mais frequentemente no exterior das habitações, facilitando o contacto com os flebótomos e a posterior infecção por *Leishmania* (Noli *et al.*, 2006). Alguns autores afirmam que, na mesma área geográfica, os canídeos de pêlo curto têm maior prevalência da doença que os canídeos de pêlo comprido (Rosypal *et al.*, 2003). As raças portuguesas incluídas na amostra são também de animais de grande porte, que tradicionalmente estão associados a actividades ao ar livre, como a caça (Podengo Português Grande) ou o pastoreio/guarda (Cão da Serra da Estrela). Contudo, as raças nacionais foram pouco prevalentes, o que pode ser devido a estas se encontrarem em menor número na população total da clínica VET APAAC ou, por outro lado, sugere que estas raças são menos susceptíveis à Leishmaniose canina que as raças importadas, como foi verificado num estudo recente (Pereira, 2008).

Tendo em conta a área de proveniência de cada um dos canídeos, verificou-se que 79% da amostra residia no concelho do Cartaxo, o que pode ser justificado pela localização da clínica VET APAAC, na sede deste concelho, estando acessível aos proprietários dos animais que residam nesta área. Não existe um estudo concreto que indique a prevalência da Leishmaniose canina nesta área geográfica nacional, mas está descrita uma seroprevalência de 5-10% no distrito de Santarém (ONLeish, 2011).

Todos os animais do estudo passavam grande parte do tempo ao ar livre, sendo que 63% (12/19) tinham a possibilidade de estarem dentro e fora de casa, enquanto os restantes 37% (7/19) viviam exclusivamente no exterior. Estes resultados corroboram a ideia defendida pela maioria dos autores, isto é, os cães mantidos, permanentemente ou com elevada frequência, no exterior das habitações estão mais propensos a serem infectados, uma vez que se encontram mais expostos aos insectos vectores (Rosypal *et al.*, 2003). Contudo, importa referir que a permanência dos animais em locais menos acessíveis aos flebótomos é um factor limitante, porém não impeditivo, de infecção por *L. infantum*.

As medidas de prevenção da picada dos insectos vectores eram aplicadas na maioria da população estudada (84%), sendo os principais compostos utilizados a associação de

permetrina e imidaclopride (Advantix<sup>®</sup>) e as coleiras impregnadas com deltametrina (Scalibor<sup>®</sup>). Esta situação pode ser explicada pelo esquecimento, por parte dos proprietários, da duração da eficácia destes produtos, uma vez que exigem renovação ao fim de 3-4 semanas (Advantix<sup>®</sup>) ou de 6 meses (Scalibor<sup>®</sup>). Deste modo, é fundamental sensibilizar os donos dos animais para a prevenção eficaz contra o flebótomo, tendo em conta as recomendações específicas de cada produto, sobretudo no que diz respeito à correcta aplicação e frequência da reaplicação, reforçando ainda a importância da sua utilização durante a época de maior actividade vectorial (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

As características clínicas da Leishmaniose canina variam amplamente como consequência dos numerosos mecanismos patogénicos do protozoário, da diversidade de respostas imunológicas desenvolvidas nos hospedeiros e dos diferentes órgãos afectados (Solano-Gallego & Baneth, 2008). Geralmente, a manifestação inicial desta doença é a alteração do estado geral do animal, com perda de peso progressiva, prostração e anorexia (Campillo *et al.*, 1999). De facto, foi possível comprovar que 26% dos animais se encontravam prostrados/letárgicos, 16% manifestava perda de apetite e em 32% ocorreu perda de peso.

A linfadenopatia foi verificada na maioria dos canídeos, ou seja em cerca de 68% da população total estudada. Os linfonodos mais afectados foram os poplíteos e os sub-mandibulares, apesar de ter estado presente uma linfadenopatia generalizada em cerca de 38% dos animais. Diversos autores afirmam que a hipertrofia dos linfonodos é uma das manifestações clínicas mais consistentes na Leishmaniose canina e, apesar de poder ser localizada, é mais frequente ocorrer uma linfadenomegália generalizada, havendo alterações principalmente nos linfonodos sub-mandibulares, poplíteos, pré-escapulares e axilares (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

A sintomatologia dermatológica esteve presente em 17 animais (89%) da amostra, sendo as manifestações mais frequentes a seborreia seca (9 canídeos), a alopecia peri-ocular e do focinho (9 canídeos) e as lesões ulcerativas nos membros e pavilhões auriculares (7 canídeos). Baneth *et al.* (2008) defendem que 81-89% dos cães sintomáticos apresentam lesões cutâneas, o que está de acordo com os resultados deste estudo. Por outro lado, todas as alterações da pele observadas estão descritas, na maior parte da bibliografia consultada, como sendo as lesões dermatológicas mais características desta doença canina (Noli *et al.*, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008; Bourdeau, 2009). A onicogribose, apesar de ter sido pouco frequente na população estudada (11%), é uma alteração específica que ocorre numa pequena proporção de animais infectados por *Leishmania* (Baneth, 2006).

Em três canídeos (16%) da amostra, verificou-se a presença de lesões oftalmológicas, das quais se destacam a conjuntivite, uveíte e úlcera da córnea, sendo que num dos animais existia

também neovascularização. Segundo Alexandre-Pires & Correia (2008), as conjuntivites, queratites e uveítes são lesões oculares frequentes na Leishmaniose canina, podendo surgir, em fases mais avançadas da patologia ocular, complicações como a úlcera da córnea e a neovascularização, o que corrobora os resultados obtidos neste estudo. Os mesmos autores descrevem a possibilidade de ocorrerem lesões granulomatosas nas pálpebras dos animais com Leishmaniose, o que sucedeu num dos canídeos da amostra. Defendem ainda que as lesões do globo ocular podem surgir por acção directa do parasita ou por processos imunológicos, que levam à formação e deposição de complexos imunes (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

No que diz respeito à sintomatologia ortopédica, esta foi identificada em 21% (4 animais) da amostra, sendo a claudicação a manifestação mais frequente. A maioria dos autores considera que estas alterações locomotoras se devem a poliartrite, a sinovite, a periostite, ou menos frequentemente, a miosite, que estão associadas à presença e deposição de complexos imunes (reação de hipersensibilidade tipo III) (Kohn, 2007; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Contudo, importa referir que em dois destes canídeos, a claudicação não estava provavelmente relacionada com a Leishmaniose, visto terem sido detectadas outras causas para esta sintomatologia (artroses nos membros posteriores).

Apesar de estar descrita a ocorrência de gastrite e enterite nos cães com Leishmaniose, a sintomatologia gastrointestinal foi observada apenas em 2 animais (11%) da amostra, que apresentavam diarreia e vômito. Noli *et al.* (2006) defendem que estes sinais clínicos podem resultar da lesão directa do protozoário no tracto gastrointestinal ou ser consequência das alterações hepáticas e renais típicas desta doença. Nos casos clínicos observados, esta segunda hipótese foi considerada a mais provável, visto que os parâmetros bioquímicos renais e hepáticos daqueles animais se encontravam alterados, no momento da apresentação clínica.

Apenas num canídeo (5%) da população total estudada ocorreu epistáxis bilateral. Alguns autores consideram como principais mecanismos responsáveis pela sua ocorrência as alterações na coagulação, causadas pela trombocitopénia e hiperglobulinémia, a presença de úlceras na mucosa nasal e a vasculite por deposição de complexos imunes (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Baneth *et al.*, 2008). Por outro lado, Pereira da Fonseca & Villa de Brito (2008) afirmam que a epistáxis parece estar mais relacionada com lesões inflamatórias da mucosa nasal do que com alterações dos mecanismos de coagulação. No animal com epistáxis observado durante o estágio curricular, estavam presentes Leishmaniose e Erliquiose, sendo estas duas doenças que causam vasculite por deposição de complexos imunes e trombocitopénia (também identificada neste canídeo).

A poliúria e polidipsia foram referidas apenas em 2 animais (11%), sendo que num deles esta sintomatologia foi pontual e desapareceu após instituída a terapêutica anti-*Leishmania*. Contudo, no outro caso clínico foi diagnosticada Insuficiência Renal Crónica no estadio III. De facto, a doença renal é frequente durante o curso da Leishmaniose canina e pode progredir de proteinúria assintomática até síndrome nefrótico ou Insuficiência Renal Crónica (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Bourdeau, 2009). O quadro sintomatológico associado a IRC é muito diversificado, do qual se destaca a PU/PD, o vómito e a palidez das mucosas, todos eles identificados naquele canídeo (Elliott & Lefebvre, 2008). No entanto, nos restantes animais da amostra, mesmo os que apresentavam IRC, não foi descrita a ocorrência de PU/PD. Esta situação pode ser explicada pelo facto da maioria dos canídeos se encontrar frequentemente no exterior das habitações, o que torna difícil o controlo, pelos proprietários, da frequência de micção e de ingestão de água. É importante referir ainda que no animal onde foi diagnosticada IRC no estadio III, existia também ascite, uma das alterações clínicas compatíveis com o síndrome nefrótico (Nelson & Couto, 2003).

A realização de exames complementares permitiu identificar como alterações hematológicas mais frequentes a trombocitopénia (19%), leucopénia (19%), linfopénia (13%), eosinopénia (19%) e anemia, com diminuição dos valores de hematócrito, eritrócitos e hemoglobina, em 38% da amostra estudada. A maioria dos canídeos que desenvolveram anemia, no decorrer da doença, apresentava valores de VCM e CHCM dentro dos padrões considerados normais, o que permitiu classificar a anemia como normocítica e normocrómica, ou seja não-regenerativa. Diversos autores afirmam que este tipo de anemia é frequentemente encontrado nos animais com Leishmaniose, podendo estar presente, mais raramente, uma anemia regenerativa hemolítica (macrocítica e hipocrómica), causada por mecanismos imunomediados (Baneth, 2006). Por outro lado, Campillo *et al.* (1999) defendem que em alguns animais com Leishmaniose prevalece a anemia normocítica e hipocrómica, o que se verificou num dos canídeos da amostra, no qual existia um valor ligeiramente diminuído de CHCM, mas sem alteração do volume corpuscular médio. A anemia geralmente desenvolve-se como consequência da diminuição da eritropoiese, resultante da doença crónica ou da Insuficiência Renal Crónica, sendo agravada por hemorragia e destruição imunomediada dos eritrócitos (Baneth, 2006; Baneth *et al.*, 2008).

A leucopénia, linfopénia e eosinopénia foram as principais alterações observadas no leucograma dos animais da amostra estudada. Alguns autores referem ser frequente a detecção de leucopénia, com redução das populações de monócitos, de eosinófilos e sobretudo de linfócitos, nos canídeos com Leishmaniose. Esta redução do número de leucócitos resulta do sequestro dessas células em diversos tecidos e órgãos e da diminuição da hematopoiese

devido a disfunção medular, por parasitismo intenso da medula óssea (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A trombocitopenia, identificada nos canídeos da amostra, também está descrita nas infecções por *Leishmania*, podendo ser consequente da presença de complexos imunes circulantes e auto-anticorpos, de sequestro esplênico ou da supressão medular (Baneth, 2006).

A alteração bioquímica mais frequentemente relacionada com a Leishmaniose canina é a hiperproteinemia, com hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, resultando numa diminuição do rácio albumina/globulina (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). De facto, apesar destes parâmetros bioquímicos terem sido avaliados num número reduzido de animais da população, verificou-se que existia hiperproteinemia em 75% (6/8 canídeos), hiperglobulinemia em 67% (4/6 canídeos) e hipoalbuminemia em 29% (2/7 canídeos). Segundo Noli *et al.* (2006), a hipoalbuminemia resulta da nefropatia com perda proteica, das alterações hepáticas, da má nutrição e/ou dos mecanismos de equilíbrio osmótico plasmático. Em relação aos proteinogramas realizados, na maioria dos animais, constatou-se um aumento das globulinas, sobretudo das fracções beta e gama, o que está de acordo com vários autores (Roze, 2005; Noli *et al.*, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Bourdeau, 2009). As principais causas desta hipergamaglobulinemia parecem ser a estimulação policlonal dos linfócitos B, mediada pelos antígenos do protozoário, a produção de anticorpos não específicos e a presença de complexos imunes circulantes (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). É de salientar que o proteinograma foi realizado num número restrito de animais da amostra, e deveria ser utilizado com mais frequência na prática clínica, porque pode auxiliar no diagnóstico de Leishmaniose, permite monitorizar a evolução da doença e da resposta ao tratamento e possibilita também a detecção das eventuais recidivas (Roze, 2005; Noli *et al.*, 2006).

Adicionalmente, foram identificadas alterações nos parâmetros bioquímicos hepáticos, nomeadamente aumento da FAS em dois canídeos e de ALT apenas num animal. De facto, nos cães com Leishmaniose que apresentam lesões hepáticas crónicas, pode-se verificar um aumento moderado das enzimas hepáticas, que tem tendência a normalizar após o tratamento (Baneth, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

A Leishmaniose canina provoca lesões renais glomerulares, intersticiais e tubulares graves, específicas da doença e estreitamente relacionadas com a alteração da função renal (Gomes *et al.*, 2008). A glomerulonefrite é a mais frequente e está geralmente associada à deposição e formação local de complexos imunes (Baneth *et al.*, 2008). As alterações renais traduzem-se, em termos bioquímicos, no aumento da creatinina e da ureia plasmáticas, o que foi verificado em 22% (4/18) dos canídeos da amostra estudada, nos quais se diagnosticou IRC.

Os resultados obtidos através da interpretação das tiras reactivas de urina, utilizadas em 6 animais, revelaram que todos eles apresentavam proteinúria e que apenas num canídeo (17%) estava presente hematória. De facto, uma das primeiras consequências fisiopatológicas da glomerulonefrite é a perda urinária de proteínas plasmáticas, como a albumina, resultante das alterações na permeabilidade da membrana basal glomerular (Nelson & Couto, 2003). Nos quatro animais que apresentam IRC, foi ainda avaliado o rácio UPC, que permitiu confirmar a presença de proteinúria em dois dos canídeos, uma vez que existiam valores acima de 0,5 (Pressler, 2006). Esta perda urinária de proteína promove a progressão das lesões glomerulares e tubulo-intersticiais e, se for persistente, pode desencadear o aparecimento de alterações clínicas compatíveis com síndrome nefrótica, como hipoalbuminémia, ascite, edema periférico e hipercolesterolemia (Nelson & Couto, 2003). Efectivamente, um dos canídeos com IRC apresentava um rácio UPC igual a 17,2, hipoalbuminémia, hipoproteinémia e ascite, tendo conduzido ao diagnóstico de síndrome nefrótica. Contudo, as análises à urina só foram realizadas em 32% da população total deste estudo retrospectivo e, na opinião da autora, deveriam ser utilizadas com maior frequência nos animais com Leishmaniose, visto que a doença renal pode ser a única manifestação clínica nos canídeos infectados, sendo responsável pela degradação do estado geral e a principal causa de morte nesses animais.

A IRIS propôs um sistema de classificação composto por quatro estádios de evolução da IRC canina, estabelecidos de acordo com as concentrações séricas de creatinina, uma vez que esta é um marcador da taxa de filtração glomerular, permitindo detectar a deterioração da função renal (Brown, 2005; Waki *et al.*, 2010). Neste estudo retrospectivo foi efectuado o estadiamento nos 4 canídeos com IRC, com base no valor médio das concentrações plasmáticas de creatinina, como é proposto pela IRIS. Waki *et al.* (2010) referem que esta determinação idealmente deve ser realizada nos animais estáveis, em jejum e hidratados, em dois ou três momentos clínicos diferentes, o que nem sempre foi possível, tendo-se utilizado nesses casos o valor de creatinina apresentado na primeira consulta. Verificou-se que dois dos canídeos se encontravam no estadio II (creatinina plasmática entre 1,4-2,0 mg/dL), enquanto os restantes dois animais foram classificados no estadio III (creatinina plasmática entre 2,1-5,0 mg/dL). No estadio II (azotémia renal ligeira) ocorre perda progressiva de tecido renal funcional, não havendo sintomatologia ou estando presentes sinais clínicos ligeiros, como PU/PD, que no entanto não foram referidos nos pacientes observados. No estadio III (azotémia renal moderada) existe declínio da taxa de filtração glomerular, podendo ocorrer sintomatologia sistémica, o que foi relatado em ambos os canídeos da amostra (IRIS, 2009a).

Após a realização do estadiamento da IRC, a IRIS recomenda ainda que, sempre que possível, estes animais sejam sub-estadiados de acordo com a quantidade de proteína excretada na urina e com a pressão arterial sistémica. Porém, neste estudo apenas foi possível considerar a proteinúria, uma vez que não foi determinada a presença de hipertensão. O sub-estadiamento com base na proteinúria deve ser feito após exclusão das causas pré-renais e pós-renais de perda urinária de proteína, como inflamação ou hemorragia do tracto urinário posterior, sendo necessário confirmar a sua persistência, através da medição do rácio UPC, em três ou mais amostras de urina, recolhidas com um intervalo mínimo de duas semanas (IRIS, 2009a). Contudo, por questões económicas dos proprietários, apenas foi realizada uma determinação do rácio UPC por paciente, não tendo sido possível confirmar a persistência da proteinúria. De qualquer forma, constatou-se que os dois canídeos com estadio II de IRC eram proteinúricos no limite (rácio UPC entre 0,2-0,5), enquanto que os rácios obtidos nos dois animais com estadio III de doença renal, permitiram classificá-los como proteinúricos (rácio UPC > 0,5). Idealmente, os cães proteinúricos no limite devem ser reavaliados após dois meses, para que seja feita a sua correcta classificação (IRIS, 2009a). Por outro lado, para os animais proteinúricos ou proteinúricos no limite a importância do resultado depende do estadio da IRC em que se encontram. Deste modo, a presença de proteinúria é mais significativa no estadio III que no estadio I, pois a quantidade de proteína filtrada diminui com a redução do tecido renal funcional (Elliott & Watson, 2010).

O estadiamento e sub-estadiamento da IRC permite conhecer a gravidade das lesões renais, estabelecer uma abordagem terapêutica adequada e realizar a correcta monitorização do animal.

No que diz respeito aos resultados obtidos nos exames imagiológicos, a sua interpretação na amostra em estudo é mais difícil, uma vez que não foram realizados uniformemente em todos os canídeos, tendo sido requisitados para averiguar sintomatologias pontuais, como a claudicação, ou para diagnosticar doenças concomitantes, como a piómetra.

Na maioria dos animais da amostra, existia um quadro clínico característico e alterações laboratoriais altamente sugestivas de Leishmaniose canina, como refere Campillo *et al.* (1999). No entanto, o diagnóstico clínico desta doença pode tornar-se complexo, sendo imprescindível a utilização de métodos laboratoriais específicos, que permitam detectar a Leishmaniose nos animais sintomáticos, mas também nos cães infectados e clinicamente saudáveis (Ferrer, 1999; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Neste estudo, o método de diagnóstico mais utilizado foi a imunocromatografia rápida (76%, ou seja 13/17), tendo-se recorrido à associação entre essa técnica e a imunofluorescência indirecta em apenas 4 canídeos (24%). No método de IFI, o limiar de positividade foi 1/160 e

todos os animais tiveram resultado positivo, havendo assim concordância entre as duas técnicas serológicas utilizadas. Contudo, é fundamental conhecer as bases e as limitações de cada uma das técnicas de diagnóstico, bem como saber interpretar apropriadamente os seus resultados (Ferrer, 1999; Solano-Gallego & Baneth, 2008). Assim, a imunocromatografia rápida e a IFI são duas técnicas indirectas de diagnóstico, que se baseiam na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes, principalmente IgG (Ferrer, 1999). A imunocromatografia rápida foi mais frequentemente utilizada neste estudo devido à facilidade de execução e à obtenção rápida do resultado (em 10 minutos), mas a sua eficiência no diagnóstico de Leishmaniose canina é menor que nos métodos IFI e ELISA, apresentando uma especificidade entre 61-100% e sensibilidade baixa, entre 30-70% (Otranto *et al.*, 2005; CLWG, 2007). Por outro lado, a imunofluorescência indirecta revela uma elevada sensibilidade (90-100%) e especificidade (80-100%), sendo considerada o método serológico de referência (CLWG, 2007; Romero-Peñuela & Sánchez-Valencia, 2007). Contudo, as técnicas serológicas apresentam uma forte limitação devido à impossibilidade de diagnosticar a doença quando não há produção de anticorpos, como ocorre durante o período de seroconversão ou nos animais considerados resistentes e assintomáticos (Noli *et al.*, 2006). Idealmente, os resultados serológicos deveriam ser interpretados em conjunto com o quadro clínico e laboratorial de cada animal, e confirmados posteriormente através de outro método de diagnóstico, como o exame parasitológico directo e/ou o PCR. Porém, o custo e o tempo necessário para a realização de todas estas técnicas são demasiado elevados, condicionando a sua aplicação na prática clínica.

Adicionalmente, verificou-se que em 2010 foram diagnosticados 2/19 cães (11%), enquanto em 2011, até ao mês de Fevereiro, foram identificados 9/19 animais com esta doença (47%). Por outro lado, durante o estágio curricular compareceram à consulta na clínica 8 animais diagnosticados nos anos 2008 e 2009, para monitorização da Leishmaniose, pela ocorrência de recidivas desta doença, pelo desenvolvimento de doenças concomitantes, entre outros motivos.

As doenças concomitantes apenas estiveram presentes em 6 canídeos (32%) da amostra. Num dos animais foi diagnosticada também Erliquiose, que pode conduzir a um quadro sintomatológico e lesional similar ao da Leishmaniose, não permitindo concluir qual das doenças é a principal responsável pelas manifestações clínicas (epistáxis) e laboratoriais (azotémia, proteinúria, anemia, trombocitopénia) do animal. Alguns autores afirmam que pode ocorrer imunossupressão na Leishmaniose canina, contribuindo para o aparecimento de co-infecções, como a Erliquiose, a Babesiose, a Hepatozoonose, a Demodecose ou a Dirofilariose (também identificada num dos canídeos da amostra), dificultando o diagnóstico

da Leishmaniose e agravando o quadro clínico (Roze, 2005; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Deste modo, é fundamental detectar precocemente as doenças que evoluem em conjunto com o protozoário *Leishmania*, para que se estabeleça a correcta abordagem terapêutica e se aperfeiçoe a monitorização do animal.

Relativamente à terapêutica etiológica instituída, verificou-se que em cerca de 47% (9/19) dos canídeos se utilizou alopurinol em monoterapia e que 9 animais (47%) receberam tratamento combinado entre o alopurinol (leishmaniostático) e o antimoniato de glucamina (leishmanicida). A dose de alopurinol (Zyloric<sup>®</sup>) administrada foi de 20 a 30 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, sendo instituída indefinidamente, o que está de acordo com o que é referido por Roze (2005). Por outro lado, alguns autores afirmam que as doses recomendadas deste fármaco se encontram entre 5-40 mg/Kg/dia, sendo administradas por via oral, durante um período de 2 a 24 meses (Meireles, 2008; Oliva *et al.*, 2008). Em relação ao antimoniato de glucamina (Glucantime<sup>®</sup>), a dose considerada foi de 100 mg/Kg, uma vez ao dia, por via subcutânea, numa série de 10 injeções, realizadas em dias alternados, sendo repetido o ciclo de tratamento após uma semana de intervalo, durante a qual era feita a reavaliação do animal. De salientar que num dos canídeos, este fármaco foi instituído apenas após estabilização dos parâmetros bioquímicos renais. Meireles (2008), refere que a dose recomendada de Glucantime<sup>®</sup> é de 100 mg/Kg, em injeção diária, de preferência por via subcutânea, visto que esta permite maior permanência do fármaco no organismo e origina menor reacção inflamatória local, o que foi seguido neste estudo retrospectivo. Quanto à duração da terapêutica, a maioria dos autores recomenda 2 ou 3 séries de administrações diárias, durante 20 a 30 dias consecutivos ou em dias alterados, com um intervalo em cada série de 15 dias a um mês. (Campillo *et al.*, 1999; Noli *et al.*, 2006; Meireles, 2008).

Para além destes dois protocolos terapêuticos, num único canídeo optou-se pela associação entre o alopurinol e a miltefosina (leishmanicida), uma vez que apresentava IRC no estadio III. De facto, a miltefosina possui a vantagem de não ser eliminada pela via renal, podendo assim ser indicada para os cães com IRC, sem necessidade de ajustar a dose normalmente aplicada (Meireles, 2008; Oliva *et al.*, 2008). É recomendado utilizar a miltefosina (Milteforan<sup>®</sup>) na dose de 2 mg/Kg/dia, por via oral (de preferência juntamente com a dieta), durante 28 dias, tendo sido exactamente este o protocolo seguido durante o estudo retrospectivo (Meireles, 2008).

Constatou-se que, dos 19 animais, 9 (47%) responderam eficazmente à terapêutica instituída, apresentando redução da sintomatologia e parâmetros laboratoriais dentro dos valores de referência ou significativamente melhores, quando comparados com as análises realizadas antes do tratamento. Desta fracção populacional, quatro canídeos receberam alopurinol em

monoterapia e, nos restantes cinco, foi instituído um tratamento combinado entre o alopurinol e o antimoniato de glucamina. De referir que em três destes animais se utilizou a técnica de IFI, alguns meses após o início da terapêutica, com o objectivo de reavaliar os títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, tendo-se verificado que num dos canídeos havia um resultado negativo, com a indicação de fluorescência basal, e nos restantes apenas permanecia positiva a titulação 1/80. Estes resultados permitiram considerar que naqueles animais os objectivos terapêuticos estavam progressivamente a ser atingidos, apesar de o método ideal para a monitorização da resposta ao tratamento ser o RT-PCR.

Por outro lado, 3 canídeos (16%) da amostra estudada não responderam adequadamente ao tratamento instituído, o que pode estar relacionado com diversos factores. Num dos canídeos, era utilizado apenas alopurinol e terapêutica hepatoprotectora, mas a ocorrência de complicações da própria doença em associação com a idade avançada, levaram os proprietários a optarem pela eutanásia do animal. No segundo canídeo, também era apenas administrado alopurinol, havendo recorrências frequentes da sintomatologia dermatológica. Perante esta situação, os Médicos Veterinários sugeriram a utilização de Glucantime<sup>®</sup>, porém o dono esteve sempre relutante quanto a este tipo de terapêutica, sobretudo por questões económicas. No último animal, foi instituída a terapêutica combinada de alopurinol e miltefosina, mas a presença de síndrome nefrótica tornou mais complicada a resolução da sintomatologia, sobretudo após ocorrer lapso na administração dos fármacos por parte dos proprietários, nomeadamente da furosemida, não permitindo assim obter a resposta clínica esperada.

Na bibliografia consultada é referido que, nos cães submetidos a alopurinol em monoterapia, durante um período mínimo de 2-3 meses, se verifica quase sempre uma melhoria clínica e, em parte, dos parâmetros laboratoriais, com redução da carga parasitária, porém este fármaco não possibilita a cura parasitológica, ocorrendo recidivas, sobretudo quando há suspensão da terapêutica, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo (Oliva *et al.*, 2008). Oliva *et al.* (2008) afirmam que a associação entre o alopurinol e os compostos antimoniais permite uma remissão clínica mais duradoura que a obtida quando são administrados em monoterapia, existindo geralmente uma boa tolerância dos animais a esta combinação farmacológica, o que também corrobora os resultados observados.

A terapêutica complementar, referida nos resultados, foi fundamental para a remissão da sintomatologia ortopédica, oftalmológica e dermatológica existente na Leishmaniose canina. Por outro lado, a terapêutica instituída nos animais que desenvolveram doenças concomitantes, nomeadamente Erliquiose e Dirofilariose, demonstrou ter sido bem sucedida, não tendo afectado a eficácia do tratamento administrado contra a Leishmaniose canina.

Contudo, em sete canídeos (37%) não foi possível conhecer a evolução terapêutica, porque não houve comparecimento na clínica após ter sido comunicado o tratamento a efectuar (4 canídeos), ou apenas por terem iniciado a terapêutica recentemente (3 canídeos).

Nos animais com IRC, devido à presença de anemia, foi utilizado o gluconato ferroso (Hemototal<sup>®</sup>), tendo sido também sugerida uma dieta renal terapêutica. Esta dieta apresenta restrição de sódio, proteína e fósforo, elevados níveis de fibra solúvel, vitaminas do complexo B, antioxidantes e ácidos gordos de cadeia longa ómega-3, permitindo assim a redução dos episódios de crise urémica e da mortalidade nos cães com estadio avançado de IRC e a manutenção dos animais proteinúricos, que se encontram nos estadios iniciais da doença renal (Elliott & Lefebvre, 2008; Cortadellas, 2009b). Num dos canídeos houve a necessidade de administrar fluidoterapia, tendo permanecido na clínica até à normalização dos parâmetros bioquímicos renais. No cão com síndrome nefrótica, além do controlo da anemia e do manejo alimentar, utilizou-se o ácido acetilsalicílico (Aspirina<sup>®</sup>, na dose de 0,5 mg/Kg/dia, via oral), um inibidor da enzima de conversão da angiotensina (IECA), nomeadamente o enalapril (na dose de 0,5 mg/Kg, via oral, cada 24 horas) e um diurético, como a furosemida, uma vez que existia ascite. Este fármaco foi administrado inicialmente na dose de 2 mg/Kg, via oral, cada 12 horas, durante 7 dias, sendo posteriormente reduzida para metade (1 mg/Kg) e administrada durante mais uma semana. O ácido acetilsalicílico, fornecido numa dose reduzida, permite diminuir a agregação plaquetária e assim prevenir a hipercoagulabilidade consequente do síndrome nefrótico, sem alterar o perfil de coagulação e sem prejudicar a função renal (CLWG, 2007; IRIS, 2009b). O enalapril foi utilizado porque, além do efeito na pressão arterial sistémica, reduz igualmente a pressão intraglomerular e a gravidade da proteinúria, permitindo retardar a progressão da doença renal (Elliott & Lefebvre, 2008; Cortadellas, 2009b). Cortadellas (2009a) defende que nos animais com edema e/ou ascite o ideal seria o repouso e a utilização de uma dieta com restrição de sódio, mas nos casos mais graves pode ser necessário a administração de diuréticos, em doses reduzidas devido ao risco de uma redução acentuada da perfusão renal e consequentemente resultar numa descompensação aguda do paciente, o que foi tido em conta no caso clínico observado. Geralmente, a terapêutica instituída para a doença renal é mantida ao longo da vida do animal, mas se a Leishmaniose estiver controlada, as doses utilizadas podem ser reduzidas, devendo-se continuar porém a monitorizar o rácio UPC (IRIS, 2009b).

A monitorização e o controlo da Leishmaniose canina são fundamentais, uma vez que o tratamento não permite a eliminação completa do protozoário, verificando-se normalmente apenas uma cura clínica, o que pode favorecer o aparecimento de recidivas da doença, ao fim de alguns meses ou anos. Deste modo, o Médico Veterinário deve avaliar, de preferência a

cada seis meses, a eficácia da terapêutica e a progressão da doença, através da monitorização clínica e laboratorial do paciente, alterando os protocolos aplicados de acordo com a resposta desenvolvida. É também importante que o Médico Veterinário elucide os proprietários sobre a Leishmaniose canina, o seu prognóstico, os custos prováveis do tratamento e do acompanhamento clínico e as implicações dessa doença em termos de Saúde Pública.

## **5. CONCLUSÃO**

A componente prática do estágio curricular, realizado na clínica VET APAAC durante cinco meses, permitiu consolidar a matéria estudada ao longo do curso, mas também contribuiu para adquirir novos conhecimentos e competências, enquadrados na clínica médica e cirúrgica, e para interiorizar os comportamentos adequados ao exercício da profissão.

A autora constatou que a situação sócio-económica actual constitui um factor limitante na prática da Medicina Veterinária, exigindo a selecção dos exames complementares essenciais, que permitam chegar ao diagnóstico definitivo e correcto, em cada um dos pacientes. Na Leishmaniose canina é geralmente necessário recorrer a um vasto número de exames laboratoriais e, idealmente, a mais do que um método de diagnóstico específico mas, perante a contenção de custos dos proprietários, estas medidas nem sempre podem ser realizadas. O Médico Veterinário depara-se com dificuldades semelhantes no que diz respeito à instituição da terapêutica necessária nesta doença canina, tendo que seleccionar o tratamento que melhor se adequa a cada situação encontrada.

O proprietário do animal deve estar consciente de que a terapêutica administrada apenas contribui para a remissão da sintomatologia (cura clínica) e para a diminuição temporária da capacidade infectante para os flebótomos, podendo ocorrer recidivas da doença ao fim de alguns meses ou anos. É fundamental que o Médico Veterinário reforce a importância da aplicação rigorosa do tratamento e da monitorização regular do animal, de modo a ser possível controlar a progressão da Leishmaniose canina e identificar precocemente as eventuais recidivas desta doença. Por outro lado, sendo o envolvimento renal frequente durante o curso da Leishmaniose, a monitorização regular dos canídeos infectados permite a detecção de Insuficiência Renal Crónica, nos estadios iniciais, podendo assim ser evitada a progressão das lesões renais, com instituição imediata da terapêutica apropriada.

No que diz respeito à prevenção, o Médico Veterinário deve informar os donos dos animais sobre as medidas que podem ser aplicadas contra os vectores biológicos, uma vez que estas contribuem directamente para a diminuição da incidência da Leishmaniose canina, assim

como conduzem à redução da densidade do vector e à diminuição da probabilidade de o Homem adquirir esta doença.

De forma a reduzir a incidência da Leishmaniose canina, a indústria farmacêutica deve continuar a investir na produção de fármacos mais eficazes e de novos métodos profiláticos. Actualmente, existem elevadas expectativas em relação à primeira vacina comercializada na Europa e recentemente disponível em Portugal.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Afonso, M.O. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 27-40). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Alexandre-Pires, G.M. & Correia, J.J. (2008). Capítulo IV: Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 53-68). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Aresu, L., Valenza, F., Ferroglio, E., Pregel, P., Uslenghi, F., Tarducci, A. & Zanatta, R. (2007). Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol. 19, Issue 5, 569-572.
- Baneth, G. & Shaw, S.E. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, Vol. 106, Issue 4, 315-324.
- Baneth, G. (2006). Leishmaniasis. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3<sup>rd</sup> edition). (pp. 685-698). Philadelphia: Saunders Elviesier.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis, part one. *Trends in Parasitology*, Vol. 24, nº 7, pp. 324-330.
- Barbiéri, C.L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, Vol.28, nº 7, 329-337.
- Bourdeau, P.J. (2009). Update on canine leishmaniosis: From infection to optimized management [versão electrónica], *Proceedings of the Bayer Pre-Congress Symposium, Bled, Slovenia*, pp. 10-27. Acedido em Fev. 10, 2011, disponível em: [http://www.baytril.com.au/Libraries/Conferences/Proceedings\\_of\\_the\\_Bayer\\_Pre-Congress\\_Symposium\\_ESVD\\_ECVD\\_2009.sflb.ashx](http://www.baytril.com.au/Libraries/Conferences/Proceedings_of_the_Bayer_Pre-Congress_Symposium_ESVD_ECVD_2009.sflb.ashx)
- Brown, S. (2005). Stage and management of chronic renal failure [versão electrónica], *Proceedings of the North American Veterinary Conference, Florida, 8-12 January*. Acedido em Fev. 9, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2005/SAE/210.pdf?LA=1>
- Brown, S. (2007). Diagnosing renal disease [versão electrónica], *Proceedings of the North American Veterinary Conference, Florida, 13-27 January*. Acedido em Fev. 9, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/231.asp?LA=1>
- Bueno, R. (2006). *Estudo do gene Nramp1 canino em macrófagos infectados com Leishmania Leishmania chagasi*. Tese de Doutoramento. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais.
- Campillo, M.C., Vazquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romerom H.Q. & Varela, M.C. (1999). *Parasitología veterinaria*. (pp. 651-665). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

- Campino, L., Pralong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J.M., Afonso, M.O., Dedet, J.P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*, Vol.11, nº 11, 1708-14.
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, Vol. 23, nº 5, 859-864. Acedido em Fev. 9, 2011, disponível em: <http://www.actamedicaportuguesa.com/pdf/2010-23/5/859-864.pdf>
- Canine Leishmaniasis Working Group Canine (2007). Canine Leishmaniasis: guidelines for diagnosis, staging, therapy, monitoring and prevention - Part I. Acedido em Fev. 8, 2011, disponível em: [www.gruppoleishmania.org/files/veterinaria\\_2007\\_eng.pdf](http://www.gruppoleishmania.org/files/veterinaria_2007_eng.pdf)
- Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G.J., Carreta, P., Varejao, E., Benthem, B., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Semião-Santos, S.J., Rodrigues, J., Schallig, H.D. (2004). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania spp.* Infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology*, 121, 21-32.
- Carvalho, J.P., Pereira, A.G. & Sanches, A. (2011). Um caso de leishmaniose felina. *Veterinary Medicine*, Vol.13, nº 73, 29-30.
- Ciaramella, P. & Corona, M. (2003). Canine leishmaniasis: therapeutic aspects. *Compendium*, Vol. 25, nº 5, 370-375.
- Cortadellas, O. (2009a). Diagnosis and treatment of the glomerular disease in dogs [versão electrónica]. *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference, Barcelona, Spain, 2-4 October*. Acedido em Fev. 10, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2009/eng/cortadellas2.pdf>
- Cortadellas, O. (2009b). Treatment for chronic renal disease [versão electrónica]. *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference, Barcelona, Spain, 2-4 October*. Acedido em Fev. 10, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2009/eng/cortadellas3.pdf>
- Cortes, S., Afonso, M.A., Alves-Pires, C. & Campino, L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, Vol.13, nº 9, 1431-1432.
- Cortes, S. (2008). *Diversidade genética da população parasitária de Leishmania em Portugal*. Tese de Doutoramento. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa.
- Costa, F., Guerra, J., Silva, S., Klein, R., Mendonça, I. & Goto, H. (2000). CD4<sup>+</sup> T cells, participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol.33, nº 12, 1455-1458.
- Costa, F., Goto, H., Saldanha, L., Silva, S., Sinhorini, I., Silva, T. & Guerra, J. (2003). Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology*, 40, 677-684.

- Coutinho, M.T.Z. & Linardi, P.M. (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*, 147, 320-325.
- Dantas-Torres, F., Lorusso, V., Testini, G., Paiva-Cavalcanti, M., Figueredo, L.A., Stanneck, D., Mencke, N., Brandão-Filho, S.P., Alves, L.C. & Otranto, D. (2010). Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitology Research*, Vol.106, nº4, 857-860.
- Dias, C. (2008). *Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados no distrito federal*. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília.
- Diniz, S.A., Melo, M.S., Borges, A.M., Bueno, R., Reis, B.P., Tafuri, W.L., Nascimento, E.F. & Santos, R.L. (2005). Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania sp.* in the semen of naturally infected dogs. *Veterinary Pathology*, 42, 650-658.
- Elliott, J. & Brown, S. (2004). Pocked guide to renal disease in the dog and cat. Oxfordshire: Nova Professional Media Limited.
- Elliot, D. & Lefebvre, H. (2008). Chronic renal disease: the importance of nutrition. In P. Pibot, V. Biourge & D.A. Elliott (Eds.), *Encyclopedia of canine clinical nutrition*, 267-282. New York: International Veterinary Information Service. Acedido em Fev. 10, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/advances/rc/toc.asp>
- Elliott, J. & Watson, A. (2010). Overview of the IRIS staging system for CKD. Acedido em Fev. 7, 2011, disponível em: <http://www.iris-kidney.com/education/en/education06.shtml>
- Félix, N., Mouro, S., Vilela, C., Peleteiro, M., Ferreira, A. & Niza, M. (2008). Canine leishmaniasis with nephrotic syndrome and aortic and caudal vena cava thromboembolism. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, Vol. 18, Issue 5, 526-531.
- Ferrer, L. (1999). Clinical aspects of canine leishmaniasis [versão electrónica]. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain, 28-31 January*, pp. 6-10. Acedido em Fev. 9, 2011, disponível em: [http://www.sinervia.com/library\\_files/1218555479\\_Canine\\_leishmaniasis\\_Forum\\_an\\_update\\_Barcelona\\_1999.pdf](http://www.sinervia.com/library_files/1218555479_Canine_leishmaniasis_Forum_an_update_Barcelona_1999.pdf)
- Ferrer, L. (2002a). Canine Leishmaniosis: evaluation of the immunocompromised patient [versão electrónica]. *Proceedings of the 27<sup>th</sup> WSAVA Congress, Sevilla, Spain, February*. Acedido em Fev. 10, 2011, disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2653>
- Ferrer, L. (2002b). The pathology of canine leishmaniasis [versão electrónica]. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Granada, 3-6 October*, pp. 21-24. Acedido em Fev. 9, 2011, disponível em: <http://www.studioveterinariosanrocco.it/Atti%202nd%20Int%20CanL%20Forum%20Siviglia%202002.pdf>

- Gama, R., Larangeira, D., Aguiar, P. & Barrouin-Melo, S. (2009). Ultrasound evaluation of the kidneys of dogs with visceral leishmaniasis [versão electrónica]. *Proceedings of the 34<sup>th</sup> World Small Animal Veterinary Congress WSAVA, São Paulo, Brazil*. Acedido em Fev. 9, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2009/lecture35/14.pdf?LA=1>
- Gomes, L. (2007). Nefrite intersticial na leishmaniose visceral. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal. Teresina: Universidade Federal do Piauí.
- Gomes, L., Goto, H., Guerra, J., Mineiro, A., Silva, S. & Costa, F. (2008). Lesões renais intersticiais e tubulares na leishmaniose visceral. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Vol. 103, nº 567-568, 157-163. Acedido em Fev. 10, 2011, disponível em: [http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12\\_2008/157-163.pdf](http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12_2008/157-163.pdf)
- González, L.I. (2007). *Diagnóstico de la leishmaniosis críptica en el perro. Expresión isotópica e idiotípica de los anticuerpos producidos en distintas fases de la infección*. Tesi Doctoral. Barcelona: Facultat de Farmàcia - Universitat de Barcelona.
- Gradoni, L. (2002). The diagnosis of canine leishmaniasis. [versão electrónica]. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain, February*, pp.7-14. Acedido em Fev. 9, 2011, disponível em: <http://www.studioveterinariosanrocco.it/Atti%202nd%20Int%20CanL%20Forum%20Siviglia%202002.pdf>
- Grant, D. & Forrester, S. (2001). Glomerulonephritis in dogs and cats: glomerular function, pathophysiology and clinical signs. *Compendium*, Vol. 23, nº 8, 739-747.
- Grauer, G. (2001). How is proteinuria detected? Acedido em Fev. 7, 2011, disponível em: <http://www.iris-kidney.com/education/en/education03.shtml>
- Hide, M., Bañuls, A.L. & Tibayrenc, M. (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1. Epidemiological implications. [versão electrónica]. Acedido em Fev. 8, 2011, disponível em: <http://gemi.mpl.ird.fr/PDF/HidePARASITOLOGY2001.pdf>
- IRIS. (2009a). *Staging of CKD*. Acedido em Fev. 7, 2011, disponível em: [http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS2009\\_Staging\\_CKD.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS2009_Staging_CKD.pdf)
- IRIS. (2009b). *Treatment Recommendations*. Acedido em Fev. 7, 2011, disponível em: [http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS\\_2009\\_Treatment\\_Recommendations\\_Summary.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_2009_Treatment_Recommendations_Summary.pdf)
- Killick-Kendrick, R. (2002). The life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite [versão electrónica]. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain, February*, pp. 55-69. Acedido em Fev. 9, 2011, disponível em: <http://www.studioveterinariosanrocco.it/Atti%202nd%20Int%20CanL%20Forum%20Siviglia%202002.pdf>
- Kohn, B. (2007). Canine immune-mediated polyarthritis. *EJCAP*, Vol.17, Issue 2, 119-124.

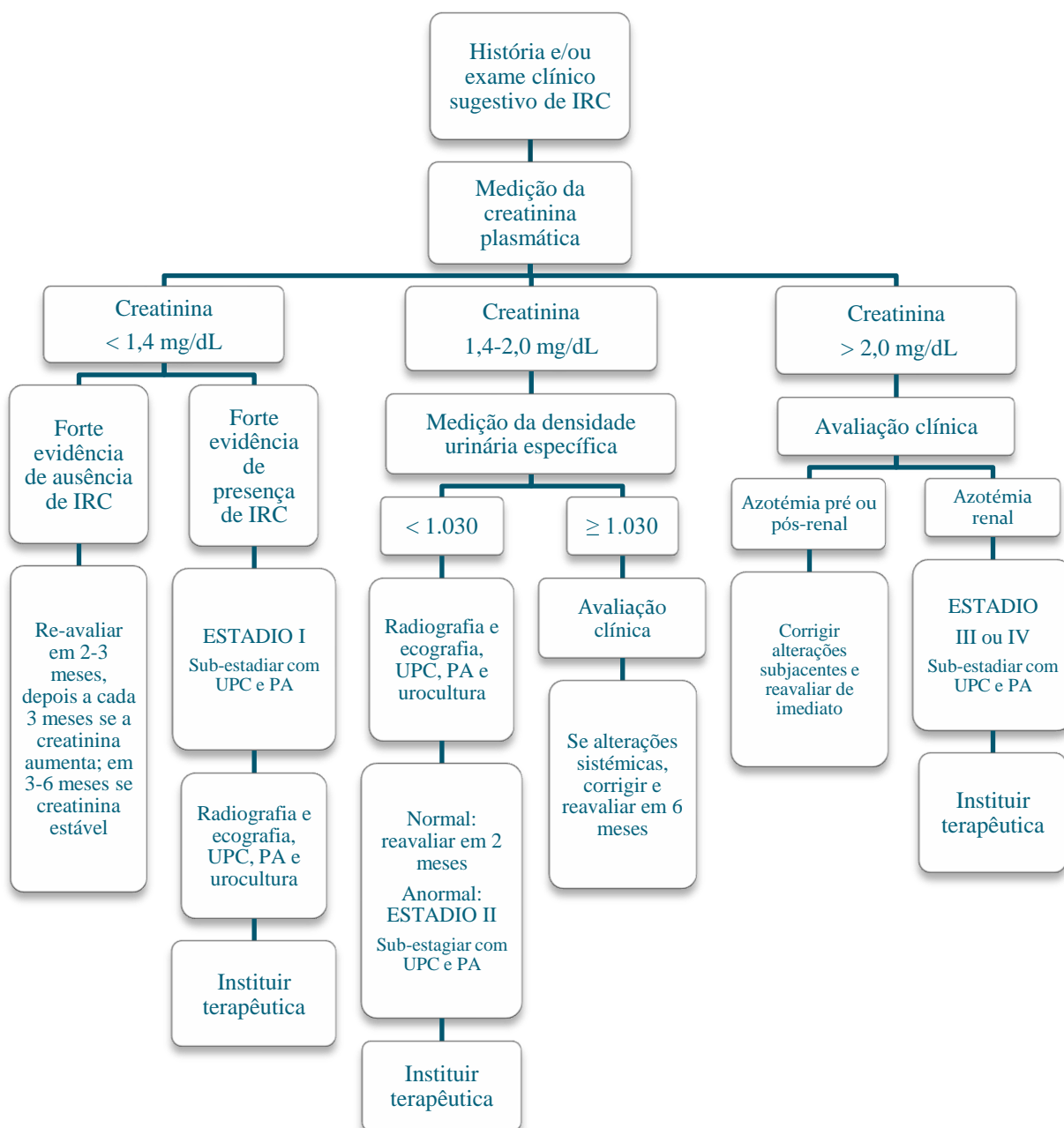
- Kommenou, A. & Koutinas, A.F. (2007). Ocular manifestations of some canine infectious and parasitic diseases commonly encountered in Mediterranean. *EJCAP*, Vol.17, Issue 3, 271-279.
- Lees, G., Brown, S., Elliott, J., Grauer, G. & Vaden, S. (2004). Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19, 377-385.
- Lees, G. & Metzger, F. (2005). The practitioner's approach to proteinuria [versão electrónica]. *Proceedings of the North American Veterinary Conference, Florida, 8-12 January*, pp. 550-552. Acedido em Fev. 7, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2005/SAE/223.pdf?LA=1>
- Lees, G. (2006). Detection of proteinuria: how to perform and interpret screening tests to detect proteinuria in dogs and cats. [versão electrónica]. *Proceedings of the International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians, Rimini, Italy, 19-21 May*, pp. 44-45. Acedido em Fev. 7, 2011, disponível em: [http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2006/lees1\\_en.pdf](http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2006/lees1_en.pdf)
- Lima, V., Gonçalves, M., Ikeda, F., Luvizotto, M. & Feitosa, M. (2003). Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 485-489.
- Maia, C. (2005). Diagnóstico laboratorial da leishmaniose canina. *Veterinária Técnica*, 2, 34-37.
- Meireles, J.A.F.S. (2008). Capítulo VII: Terapêutica e profilaxia da Leishmaniose canina. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 93-103). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Mencke, N., Volf, P., Volfova, V. & Stanneck, D. (2003). Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) on dogs [versão electrónica], *Proceedings of the 19<sup>th</sup> International Conference of the WAAVP, 10-14 August*, pp. 107-110. Acedido em Fev. 9, 2011, disponível em: <http://www.labor-freiburg.de/BayerWAAVP2003.pdf>
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M., Oliva, G. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis, part two. *Trends in Parasitology*, Vol. 24, nº 8, pp. 371-377.
- Miró, G., Solano-Gallego, L., Cardoso, L., Koutinas, A., Pennisi, M., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. (2010). Update on the management of canine leishmaniosis [versão electrónica]. *Proceedings of 5<sup>th</sup> Symposium of the CVBD World Forum, New York, 12-15 April*, pp. 50-57. Acedido em Fev. 8, 2011, disponível em: <http://www.cvbd.org/4674.0.html>
- Nelson, R. & Couto, C. (2003). Glomerulonephropathies. *Small Animal Internal Medicine*. (3<sup>rd</sup> edition). (pp 600-607). Missouri: Mosby.

- Neves, R., Cardoso, L., Afonso, M.O. & Campino, L. (2007). Leishmaniose canina em Portugal Continental – o que sabem os proprietários de cães acerca desta zoonose parasitária. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102, 386. Acedido em Fev. 10, 2011, disponível em: [http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12\\_2007/377-396.pdf](http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12_2007/377-396.pdf)
- Noli, C., Lloyd, D., Loeffler, A., Schwendenwein, I. & Meredith, A. (2006). Protozoal infections: Canine leishmaniasis [versão electrónica]. *Proceedings of Dermatology Course on the European School for Advanced Veterinary Studies, Luxembourg, 14-18 August*, pp. 19-27. Acedido em Fev. 7, 2011, disponível em: [http://www.esavs.net/course\\_notes/dermatology2\\_06/cn\\_derm2\\_week2.pdf](http://www.esavs.net/course_notes/dermatology2_06/cn_derm2_week2.pdf)
- Observatório Nacional das Leishmanioses (2011). Primeiro relatório regular da LEISHnet. *Veterinary Medicine*, Vol.13, nº 73, 31-36.
- Oliva, G., Roura, X., Crotti, A., Zini, E., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., Lubas, G., Paltrinieri, S. & Zatelli, A. (2008). Canine Leishmaniasis: guidelines for diagnosis, staging, therapy, monitoring and prevention - Part II. *Veterinaria*, Vol. 22, nº 6, 1-10.
- Otranto, D., Paradies, P., Sasanelli, M., Leone, N., Caprariis, D., Chirico, J., Spinelli, R., Capelli, G. & Brandonisio, O. (2005). Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol. 17, Issue 1, 32-37.
- Pereira, M.A.M. (2008). Capítulo III: Epidemiologia da leishmaniose canina. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 41-51). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Pereira da Fonseca, I.M. & Villa de Brito, M.T. (2008). Capítulo VI: Diagnóstico. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 83-92). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Pereira da Fonseca, I.M. & Santos-Gomes, G.M. (2008). Capítulo VIII: Perspectivas futuras. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 105-111). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (2005). *Microbiology*. (6<sup>th</sup> edition). (pp 681-758). New York: McGrawHill Higher Education.
- Pressler, B. (2006). Up close and personal with proteinuria: the dipstick, the UPC and the ERD-Healthscreen<sup>®</sup> [versão electrónica]. *Proceedings of the North American Veterinary Conference, Florida, 7-11 January*, pp. 690-692. Acedido em Fev. 7, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2006/SAE/242.asp?LA=1>
- Polzin, D. (2009) Managing fluid and electrolyte problems in patients with kidney disease [versão electrónica]. *Proceedings of 34th World Small Animal Veterinary Congress, São Paulo, Brazil*. Acedido em Fev. 7, 2011, disponível em: [www.ivis.org/proceedings/wsava/2009/lecture28/2.pdf](http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2009/lecture28/2.pdf)
- Quinnell, R.J., Kennedy, L.J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L.M., Shaw, M.A., Carter, S.D., Thomson, W. & Ollier, W.E.R. (2003). Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, 55, 23-28.

- Reis, J., Silva, F., Rachid, M. & Nogueira, R. (2001). Amiloidose renal em cão Shar-Pei: Relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Vol.53, nº 4, 1-4.
- Reis, L., Brito, M., Souza, M. & Pereira, V. (2006). Mecanismos Imunológicos na Resposta Celular e Humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista de Patologia Tropical*, Vol.35, nº2, 103-115. Acedido em Fev. 10, 2011, disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/viewArticle/1899>
- Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L. & Côrrea-Oliveira, R. (2009). Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 87-95.
- Rolão, N., Martins, M.J., João, A. & Campino, L. (2005). Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 12, 183-186.
- Romero-Peñuela, M. & Sánchez-Valencia, J. (2007). El diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina (*Leishmania infantum*). *Veterinária e Zootecnia*, 1, 51-59.
- Rosypal, A.C., Zajac, A.M. & Lindsay, D.S. (2003). Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 33, 921-937.
- Roze, M. (2005). Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. *EJCAP*, Vol.15, Issue 1, 39-52.
- Santos-Gomes, G.M., Rodrigues, O.R. & Marques, C. (2008). Capítulo V: Resposta imunológica. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 69-82). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Sharma, U. & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Disease*, 45, 255-272.
- Simões-Mattos, L., Bevilaqua, C.M.L., Mattos, M.R.F. & Pompeu, M.M.L. (2004). Feline leishmaniasis: uncommon or unknown? *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 550, 79-87. Acedido em Fev. 9, 2011, disponível em: [http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf6\\_2004/550\\_79\\_87.pdf](http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf6_2004/550_79_87.pdf)
- Soares, M., Moraes, J., Palmeira, V., Miyazato, L. & Moraes, F. (2005). Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, Vol.11, nº 4, 579-593.
- Soares, M., Moraes, J. & Moraes, F. (2009). Renal involvement in canine leishmaniasis: a morphological and immunohistochemical study. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Vol.61, nº 4, 785-790.
- Solano-Gallego, L. (2001). *Leishmania infantum* and dog: immunological and epidemiological studies about infection and disease. Tesi Doctoral. Barcelona: Facultat de Veterinària - Universitat Autònoma de Barcelona.

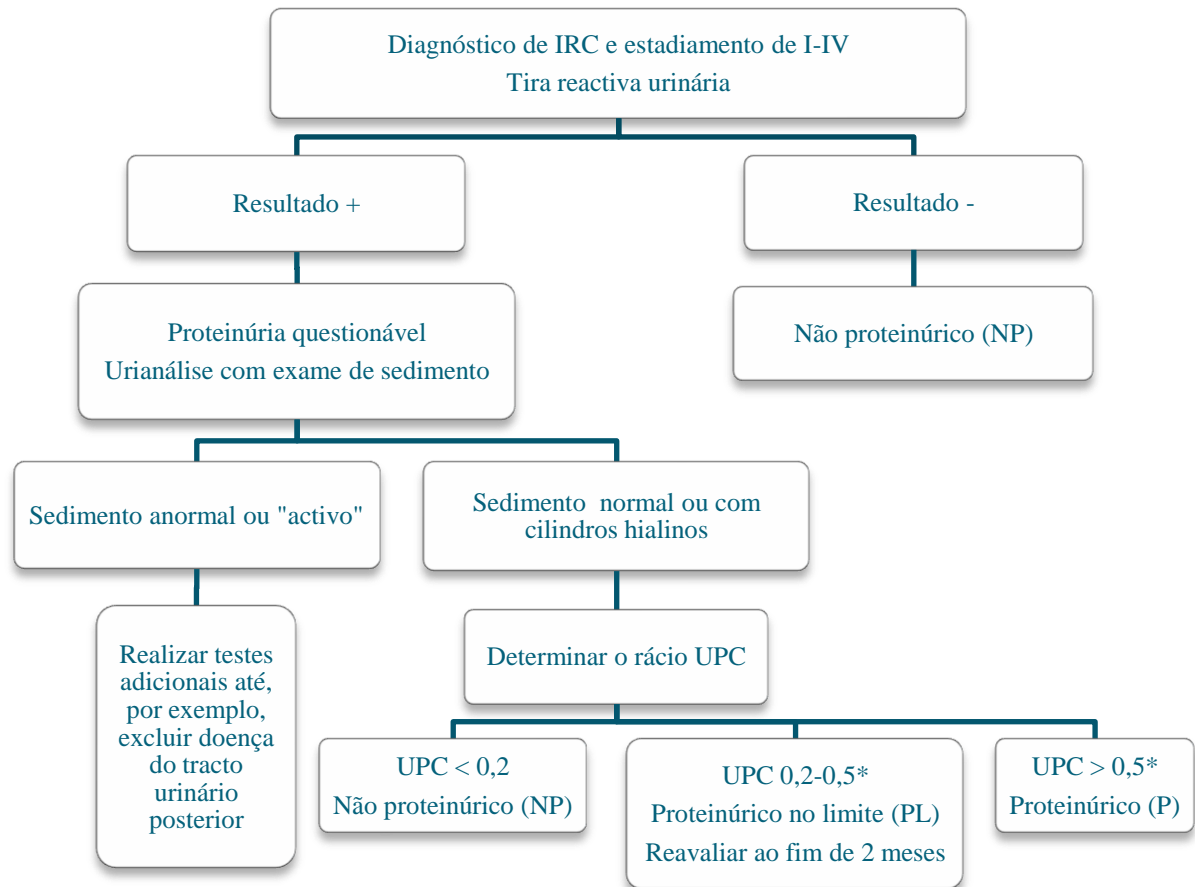
- Solano-Gallego, L., Rodríguez, A., Iniesta, L., Arboix, M., Portús, M. & Alberola, J. (2003). Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Vol.10, nº5, 849-855.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M. & Alberola, J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol.76, nº4, 676-680.
- Solano-Gallego, L. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis – a challenging zoonosis. *EJCAP*, 18, Issue 3, 232-241.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-18.
- Tomás, A. & Romão, S.F. (2008). Capítulo I: Biologia do parasita. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 7-26). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Tsachev, I., Papadogiannakis, E., Harizanov, R. & Zarkov, I. (2008). Canine visceral leishmaniosis: current situation. *Trakia Journal of Sciences*, 6, Supplement 1. Acedido em Fev. 8, 2011, disponível em: [http://tru.uni-sz.bg/tsj/Vol6N01\\_2008\\_supplement/I.Ca4ev.pdf](http://tru.uni-sz.bg/tsj/Vol6N01_2008_supplement/I.Ca4ev.pdf)
- Vouldoukis, I., Rougier, S., Dugas, B., Pino, P., Mazier, D. & Woehrlé, F. (2006). Canine visceral leishmaniasis: comparison of *in vitro* leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology*, 135, 137-146.
- Waki, M., Martorelli, C., Mosko, P. & Kogika, M. (2010). Classificação em estágios da doença renal crónica em cães e gatos: abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. *Ciência Rural*, Vol. 40, nº 10, 2226-2234.
- Watson, A. & Lefebvre, H. (2010). *Using urine specific gravity*. Acedido em Fev. 7, 2011, disponível em: <http://www.iris-kidney.com/education/en/education05.shtml>

**Anexo 1 – Algoritmo para o estadiamento da IRC nos cães, proposto pela IRIS em 2009**  
(Adaptado de IRIS, 2009a)



Legenda: IRC, Insuficiência Renal Crônica; UPC, Rácio Proteína/Creatinina Urinário; PA, Pressão Arterial Sistêmica.

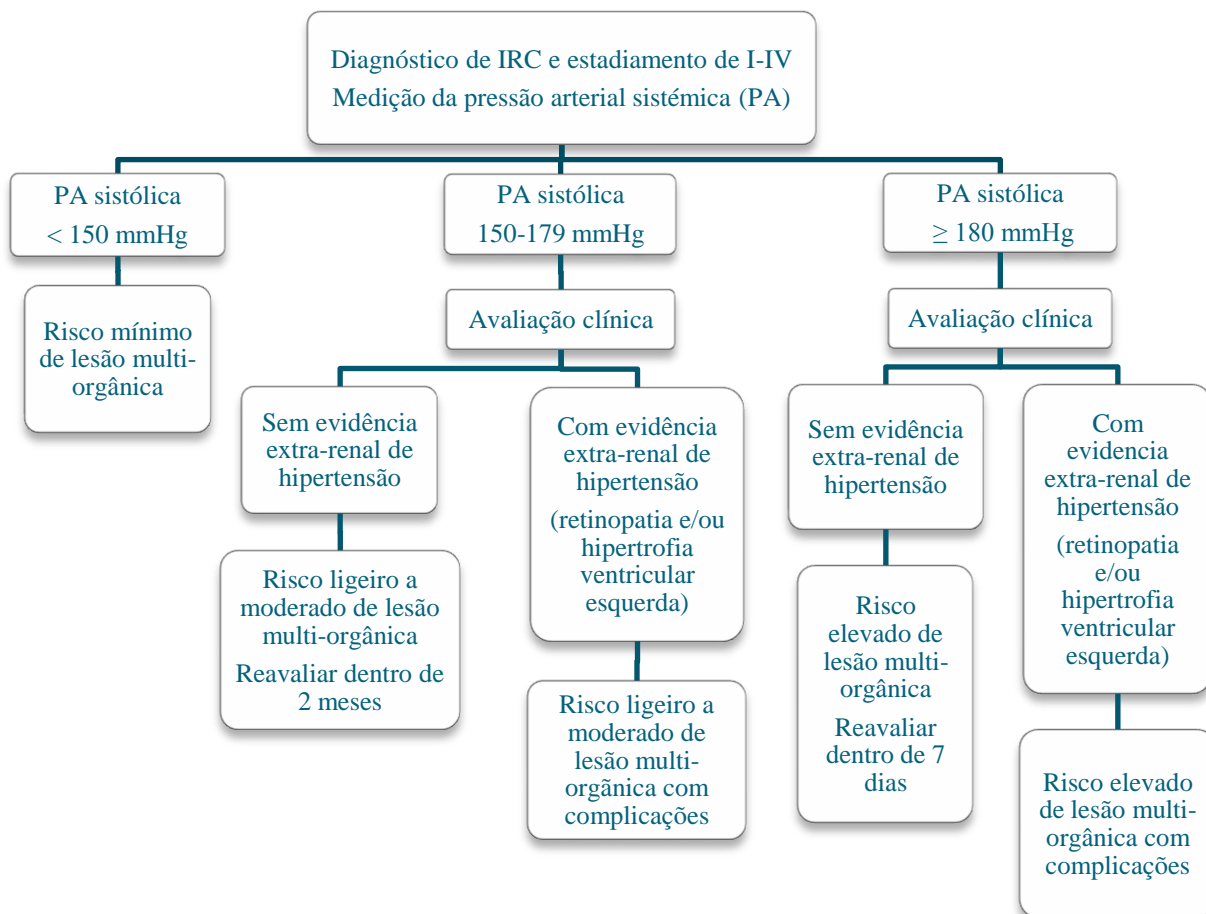
**Anexo 2 – Algoritmo para o sub-estadiamento da IRC nos cães, de acordo com o valor de proteinúria, proposto pela IRIS em 2009 (Adaptado de IRIS, 2009a)**



Legenda: IRC, Insuficiência Renal Crónica; UPC, Rácio Proteína/Creatinina Urinário;

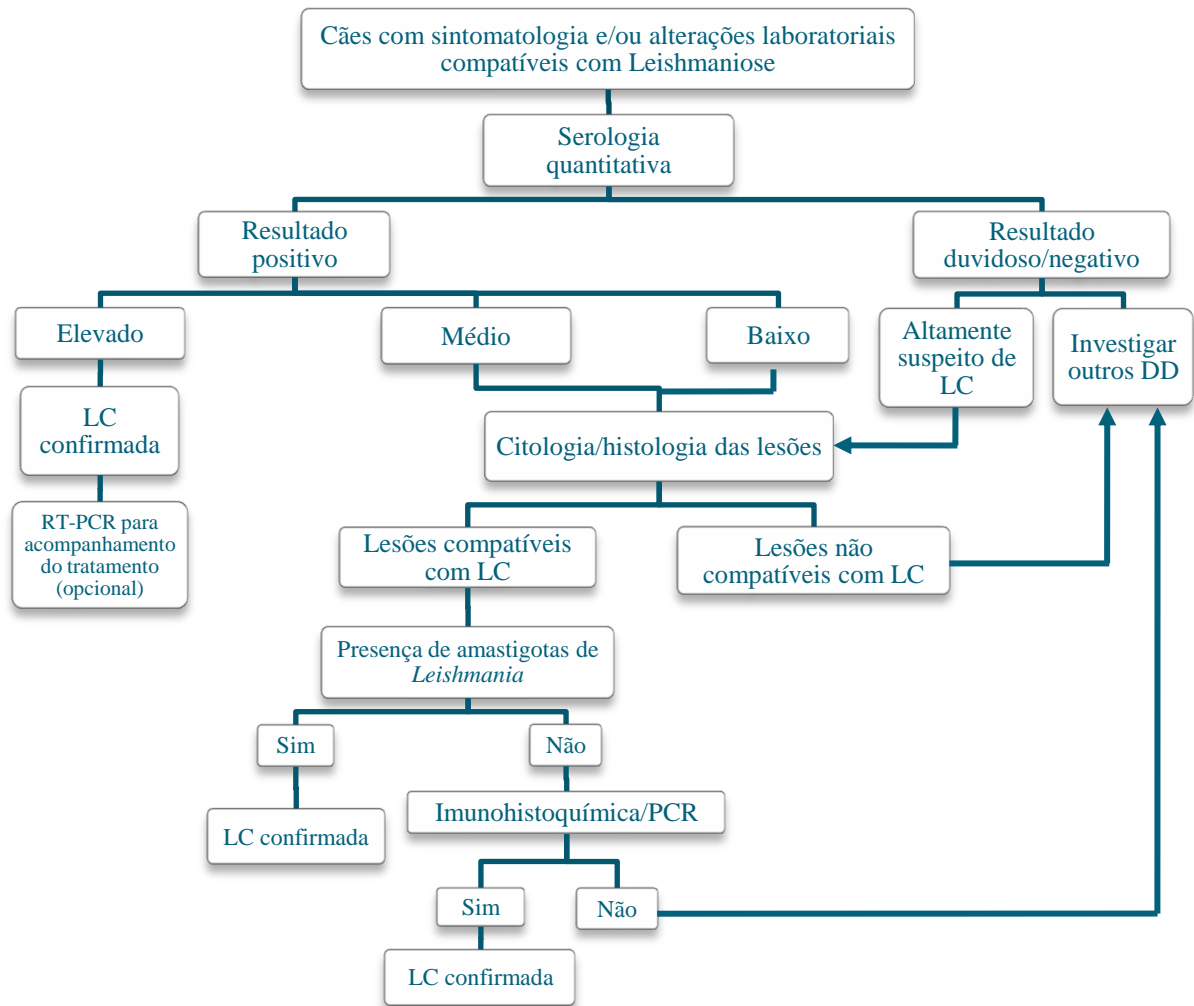
\* demonstrar a persistência da proteinúria através de reavaliação: em 2 semanas a 2 meses nos animais proteinúricos no limite, em 2-4 semanas se forem proteinúricos. Se UPC for superior a 2 não é necessário demonstrar a persistência para iniciar a terapêutica, uma vez que indica proteinúria grave.

**Anexo 3 – Algoritmo para o sub-estadiamento da IRC nos cães, de acordo com o valor da pressão arterial sistêmica, proposto pela IRIS em 2009 (Adaptado de IRIS, 2009a)**



**Anexo 4 – Algoritmo da abordagem diagnóstica nos cães com sintomatologia e/ou alterações laboratoriais compatíveis com Leishmaniose**

(Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2009)



Legenda: DD, diagnóstico diferencial; LC, Leishmaniose canina; PCR, reacção em cadeia da polimerase; RT-PCR, PCR em tempo real.

**Anexo 5 – Caracterização da amostra de canídeos com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC**

<b>Animal</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Raça</b>	<b>Localidade</b>	<b>Habitat</b>	<b>Profilaxia</b>
1	M	6	Retriever do Labrador	Lapa	Exterior e interior	Coleira
2	M	7	Setter	Cartaxo	Exterior e interior	Coleira
3	M	4	Pastor Alemão	Ereira	Exterior e interior	<i>Spot-on</i>
4	M	5	Cão da Serra da Estrela	Cartaxo	Exterior	<i>Spot-on</i>
5	M	5	Cruzado de Retriever do Labrador	Vila Nova de São Pedro	Exterior e interior	<i>Spot-on</i>
6	F	9	Indeterminada	Valada	Exterior e interior	Coleira
7	F	5	Retriever do Labrador	Pontével	Exterior e interior	<i>Spot-on</i>
8	M	6	Retriever do Labrador	Vale da Pinta	Exterior e interior	<i>Spot-on</i>
9	F	5	Pastor Alemão	Lapa	Exterior e interior	<i>Spot-on</i>
10	M	8	Pastor Alemão	Póvoa da Isenta	Exterior e interior	<i>Spot-on</i>
11	M	8	Pointer	Cartaxo	Exterior	Não aplicada
12	M	9	Indeterminada	Porto de Muge	Exterior	Coleira
13	M	5	Teckel	Pontével	Exterior e interior	Não aplicada
14	F	3	Retriever do Labrador	Pontével	Exterior e interior	Coleira
15	F	10	Husky Siberiano	Vale da Pinta	Exterior	Coleira
16	F	5	Podengo Português Grande	Maçussa	Exterior	Não aplicada
17	M	5	Cruzado de Husky Siberiano	Caldas da Rainha	Exterior	Coleira
18	M	4	Braco Alemão	Vale da Pedra	Exterior	<i>Spot-on</i>
19	F	5	Indeterminada	Cartaxo	Exterior e interior	<i>Spot-on</i>

Legenda: M, masculino; F, feminino.

**Anexo 6 – Sintomatologia dos canídeos com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC**

<b>Animal</b>	<b>Sinais clínicos</b>
<b>1</b>	Prostração; seborreia seca; alopecia peri-ocular, no flanco esquerdo e na cauda; feridas no cotovelo; conjuntivite bilateral com úlcera perfurante e neovascularização no OD.
<b>2</b>	Anorexia; linfadenopatia dos poplíteos; dermatite descamativa; claudicação do MAD; úlcera da córnea e nódulos palpebrais no OE.
<b>3</b>	Perda de peso progressiva; linfadenopatia generalizada; alopecia no focinho; feridas nos membros; claudicação do MAD.
<b>4</b>	Linfadenopatia dos poplíteos e sub-mandibulares; dermatite alopecica e descamativa no focinho; dermatite interdigital no MPD; epistáxis.
<b>5</b>	Perda de peso; onicogribose; feridas no terço posterior esquerdo.
<b>6</b>	Prostração; anorexia; dermatite alopecica e descamativa.
<b>7</b>	Uveíte anterior bilateral.
<b>8</b>	Letargia; perda de peso acentuada; linfadenopatia generalizada; seborreia seca.
<b>9</b>	Linfadenopatia ligeira dos poplíteos; lesões ulcerativas nos pavilhões auriculares e membros
<b>10</b>	PU/PD; lesões ulcerativas nos flancos, abdómen e membros.
<b>11</b>	Caquexia; linfadenopatia dos poplíteos e sub-mandibulares; alopecia peri-ocular e auricular.
<b>12</b>	Letargia; PU/PD; linfadenopatia dos poplíteos e sub-mandibulares; alopecia nos pavilhões auriculares e focinho; vômito; palidez das mucosas; ascite.
<b>13</b>	Linfadenopatia generalizada; seborreia seca; mucosas pálidas.
<b>14</b>	Perda de peso progressiva; linfadenopatia dos poplíteos; dermatite alopecica e descamativa; lesões ulcerativas nos MP.
<b>15</b>	Perda de peso; atrofia dos músculos temporais; linfadenopatia dos poplíteos; alopecia peri-ocular e no focinho; claudicação dos MP; diarreia.
<b>16</b>	Letargia; anorexia; caquexia; linfadenopatia generalizada; palidez acentuada das mucosas.
<b>17</b>	Seborreia seca; alguma dor na manipulação ortopédica do MPE.
<b>18</b>	Perda de peso acentuada; linfadenopatia generalizada; hiperqueratose do focinho.
<b>19</b>	Linfadenopatia dos poplíteos; onicogribose; seborreia seca; alopecia peri-ocular, no focinho e abdómen; lesões ulcerativas nos pavilhões auriculares e membros.

Legenda: OD, olho direito; OE, olho esquerdo; MAD, membro anterior direito; MP, membros posteriores; MPD, membro posterior direito; MPE, membro posterior esquerdo; PU/PD, poliúria/polidipsia.

**Anexo 7 – Resultados dos hemogramas dos canídeos com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC**

Animal	Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> /μL)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)
1	6,1	43	15,4	63,2	21,7	32,5	240
2	7,2	45,6	16,2	67,3	22,3	33,4	312
3	7,35	41	14,3	61,4	24,1	31,7	205
4	3,58 ↓	25,8 ↓	8,49 ↓	72	23,7	32,9	121 ↓
5	6,86	47,8	16	69,7	23,2	33,4	248
6	5,1 ↓	34,5 ↓	11,3 ↓	67,8	22,7	32,5	398
7							
8	6,54	45,1	13,8	66,1	20,5	33,7	246
9	5,71	37,2	12,6	64,6	22	34,1	139 ↓ (com agregação)
10	6,61	38,9	14,3	70,7	23,6	32	328
11	5,7	40,69	13,6	76	25,7↑	33,5	13 ↓ (abundante agregação)
12	3,8 ↓	28,87 ↓	8,6 ↓	75	22,7	29,9 ↓	177 ↓
13	3,28 ↓	21,1 ↓	7,2 ↓	64	22,1	34,3	73 ↓(com agregação)
14							
15	6,75	50,3	16	67,5	23,4	32,7	233
16	2,52 ↓	18,15 ↓	5 ↓	62	20,9	33,4	36 ↓
17	6,32	42,1	14,3	66,7	22,6	34,8	352
18	4,99 ↓	33,8 ↓	11,4 ↓	63,4	23,2	33,1	293
19							

Legenda: ↓, parâmetro diminuído; ↑, parâmetro aumentado.

**Continuação do Anexo 7 – Resultados dos hemogramas dos canídeos com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC**

<b>Animal</b>	<b>Leucócitos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	<b>Neutrófilos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	<b>Linfócitos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	<b>Monócitos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	<b>Eosinófilos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	<b>Basófilos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>
1	15,14	11,3	2,31	1,3	0,12	0,11
2	8,11	5,9	1,28	0,23	0,5	0,2
3	6,8	4,39	1,21	0,73	0,31	0,16
4	9,73	7,56	1,45	0,68	0,04 ↓	0
5	9,72	6,32	1,94	0,39	1,07	0
6	13,06	11,2	1,06	0,26	0,44	0,1
7						
8	14,47	11,39	2,35	0,22	0,38	0,13
9	4,77 ↓	3,49	0,86 ↓	0,34	0,08 ↓	0
10	7,87	4,79	1,13	1,4	0,15	0,4
11	12,88	10,08	2,25	0,45	0,1	0
12	6,62	4,62	1,05	0,45	0,5	0
13	8,92	5,54	2,5	0,46	0,19	0,23
14						
15	10,8	7,3	1,89	0,32	1,14	0,15
16	5,52 ↓	3,56	1,29	0,5	0,17	0
17	4,82 ↓	3,7	0,94 ↓	0,18 ↓	0 ↓	0
18	8,77	6,9	1,3	0,26	0,11	0,2
19						

Legenda: ↓ , parâmetro diminuído; ↑, parâmetro aumentado.

**Anexo 8 – Resultados das análises bioquímicas dos cães com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC**

<b>Animal</b>	<b>PT</b> (5,5-7,5 g/dL)	<b>Albumina</b> (2,26-4,31g/dL)	<b>Globulinas</b> (2,3-5,2 g/dL)	<b>ALT</b> (10-70U/L)	<b>FAS</b> (20-200U/L)	<b>Creatinina</b> (0,4-1,4 mg/dL)	<b>Ureia</b> (15-40 mg/dL)
1				10		1,3	14 ↓
2	10,4 ↑	2,3	8,1 ↑	40	103	0,9	36
3				20	29	1,4	21
4				40	32	1,8 ↑	50 ↑
5				65		1,1	29
6	10 ↑			10	58	0,6	8 ↓
7							
8	9,5 ↑	3,2	6,3 ↑	36	22	1	17
9	7,2	2,6	4,6	13	152	0,62	34
10	8 ↑	2,7	5,3 ↑	31	53	1	31
11					132	0,8	23
12	3,8 ↓	0,6 ↓	3,2	41	37	2,1 ↑	58 ↑
13				75 ↑	479 ↑	0,7	31
14					171	1	17
15				31	275 ↑	1	14 ↓
16					32	4,1 ↑	95 ↑
17	10,9 ↑	1,5 ↓	9,4 ↑	15	53	0,75	21
18	7,8 ↑			13	48	1,9 ↑	44 ↑
19		2,5				0,9	13 ↓

Legenda: PT, proteínas totais; ALT, alanina aminotransferase; FAS, fosfatase alcalina sérica; ↓ , parâmetro diminuído; ↑ , parâmetro aumentado.

**Anexo 9 – Diagnóstico de Leishmaniose e das doenças concomitantes nos canídeos observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC**

Animal	Ano de diagnóstico	Método de diagnóstico	Doenças concomitantes
1	2010	Imunocromatografia rápida	
2	2008	Imunocromatografia rápida; IFI positivo > 1/320	
3	2008	Imunocromatografia rápida; IFI positivo > 1/320	
4	2009	Imunocromatografia rápida	Erliquiose
5	2008	Imunocromatografia rápida; IFI positivo 1/320	Dirofilariose
6	2008	Imunocromatografia rápida	Neoplasias mamárias
7	2008	Diagnóstico realizado noutra clínica	Glossite; pseudogestação e mamite
8	2010	Imunocromatografia rápida	
9	2011	Imunocromatografia rápida	
10	2008	Diagnóstico realizado noutra clínica	
11	2011	Imunocromatografia rápida	
12	2011	Imunocromatografia rápida	
13	2011	Imunocromatografia rápida	
14	2011	Imunocromatografia rápida	
15	2008	Imunocromatografia rápida	Piómetra fechada
16	2011	Imunocromatografia rápida	
17	2011	Imunocromatografia rápida; IFI positivo 1/160	Traqueobronquite infeciosa
18	2011	Imunocromatografia rápida	
19	2011	Imunocromatografia rápida	

Legenda: IFI, imunofluorescência indirecta.

**Anexo 10 – Tratamento etiológico instituído nos canídeos com Leishmaniose observados durante o estágio curricular na clínica VET APAAC**

Animal	Tratamento inicial	Quantidade administrada	Duração	Observações
1	Zyloric® + Glucantime®	2,5 cp + 12,5 mL SC, SID	Indefinida; 2 séries de 10 injeções (em dias alternados), com 1 semana de intervalo	
2	Zyloric®	1,5 cp, SID	Indefinida	
3	Zyloric® + Glucantime®	3 cp + 13 mL SC, SID	Indefinida; 2 séries de 10 injeções (em dias alternados), com 1 semana de intervalo	
4	Zyloric®	3,5 cp, SID	Indefinida	
5	Zyloric® + Glucantime®	2 cp + 6,5 mL SC, SID	Indefinida; 2 séries de 10 injeções (em dias alternados), com 1 semana de intervalo	
6	Zyloric®	1 cp, SID	Indefinida	
7	Zyloric®	2 cp, SID	Indefinida	
8	Zyloric® + Glucantime®	2,5 cp + 12,5 mL SC, SID	Indefinida; 2 séries de 10 injeções (em dias alternados), com 1 semana de intervalo	
9	Zyloric®	2 + ¾ cp, SID	Indefinida	
10	Zyloric®	2,5 cp, SID	Indefinida	
11	Zyloric®	1,5 cp, SID	Indefinida	
12	Zyloric® + Milteforan®	1,5 cp + 2 mL PO, SID	Indefinida; 28 dias	
13	Zyloric® + Glucantime®	¾ cp + 2,5 mL SC, SID	Indefinida; 2 séries de 10 injeções (em dias alternados), com 1 semana de intervalo	
14	Zyloric® + Glucantime®	2,5 cp + 10 mL SC, SID	Indefinida; 2 séries de 10 injeções (em dias alternados), com 1 semana de intervalo	
15	Zyloric®	2,5 cp, SID	Indefinida	Eutanásia
16	Zyloric®	1 cp, SID	Indefinida	
17	Zyloric® + Glucantime®	1,5 cp + 6,5 mL SC, SID	Indefinida; 2 séries de 10 injeções (em dias alternados), com 1 semana de intervalo	
18	Zyloric® + Glucantime®	2 cp + 5 mL SC, SID	Indefinida; 2 séries de 10 injeções (em dias alternados), com 1 semana de intervalo	Glucantime® após melhoria BQ renais
19	Zyloric® + Glucantime®	1,5 cp + 6mL SC, SID	Indefinida; 2 séries de 10 injeções (em dias alternados), com 1 semana de intervalo	

Legenda: cp, comprimido; mL, mililitro; SC, via subcutânea; PO, via oral; SID, uma vez ao dia; BQ, parâmetros bioquímicos.