

MARIA LEONOR REIS FERNANDES DE LEMOS PIRES

**ESTUDO DA INFEÇÃO POR *Leishmania* spp. NUMA
COLÓNIA DE GATOS ERRANTES DA ILHA DE FARO**

Orientador Interno: Professora Doutora Margarida Alves

Orientador externo: Dr. João Soares

UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Lisboa

31 de Outubro de 2016

MARIA LEONOR REIS FERNANDES DE LEMOS PIRES

**ESTUDO DA INFEÇÃO POR *Leishmania* spp. NUMA
COLÓNIA DE GATOS ERRANTES DA ILHA DE FARO**

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado

Íntegrado em Medicina Veterinária conferido pela

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 31 de Outubro com o Despacho Reitoral nº388/2016 com a seguinte composição de Júri:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca

Orientador: Professora Doutora Margarida Alves

UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LISBOA

2016

Agradecimentos

À minha orientadora interna, Professora Doutora Margarida Alves por todo o tempo despendido, paciência e apoio incansável não só durante a tese mas durante todo o curso. Uma professora de valor que fica na memória.

Ao Doutor Luís Cardoso e à Dr^a Vera Pereira pela disponibilidade que demonstraram para tirar qualquer dúvida e pelo material cedido, essencial para a execução desta tese.

À Professora Doutora Carla Maia por todo o apoio e tempo despendido a ajudar-me durante esta tese.

Ao meu orientador externo, Dr. João Soares, por todo o conhecimento transmitido e por ter sempre demonstrado uma incansável simpatia e apoio. Contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional e ajudou-me a tomar decisões fundamentais para o meu futuro. Um veterinário e pessoa que considero um exemplo a seguir.

A toda a equipa Linda-a-Vet, pela confiança depositada em mim. Ao Dr. Pedro Fachada, Dr^a Virgínia Faria e Dr^a Inês Silva, por toda a paciência, transmissão de conhecimentos e amizade. Às auxiliares Filipa e Catarina e à estagiária Joana por todo o carinho e apoio demonstrado durante o estágio.

À minha mãe pelo apoio incansável desde o meu primeiro dia de vida. Por fazer não só o que é esperado de uma boa mãe, mas tudo o que lhe está ao alcance sem hesitar. E, não podia faltar, por ter aturado todos os meus altos e baixos durante o stress de testes e épocas de exames.

À minha avó e madrinha, pelo apoio e carinho não só demonstrado nesta tese mas em toda a minha vida. Um pilar no meu crescimento.

A toda a minha família, especialmente ao meu Pai e às minhas irmãs, Mana e Inês, por toda a atenção e apoio nos últimos 23 anos.

Ao meu grupo de amigos, nomeadamente à Madalena Gomes, Inês Bettencourt e Inês Pinho por toda a amizade e apoio e por me aturarem há tantos anos.

Aos meus cães, Raso e Zita, que me inspiraram a seguir este curso, por toda a companhia e amor incondicional.

Resumo

A leishmaniose é uma das parasitoses mais importantes em Portugal. Apesar do cão ser considerado o reservatório principal, tem-se observado um aumento do número de casos de leishmaniose na população felina. A leishmaniose felina é causada por um protozoário do género *Leishmania*. A espécie mais comum em gatos é *Leishmania infantum* sendo esta, até à data, única que afeta gatos em Portugal. A transmissão ocorre através de um inseto vetor, o flebótomo, que, quando infetado, pode transmitir a doença a um hospedeiro vertebrado, enquanto se alimenta.

O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a presença de infeção por *Leishmania* spp. numa colónia de gatos errantes residentes na Ilha de Faro, através das técnicas de imunofluorescência indireta e PCR.

A população em estudo foi constituída por 123 gatos. A estes animais foi feita a colheita de sangue periférico para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em soro por imunofluorescência indireta e de DNA do parasita em sangue total por Reação em Cadeia da Polimerase.

Os gatos tinham acesso permanente ao exterior, e cerca de 70% apresentavam algum tipo de sinais clínicos.

Todas as amostras analisadas deram resultado negativo em ambas as técnicas.

A realização deste projeto foi importante, pois, segundo o conhecimento da autora, foi o único feito numa península, apenas com acesso ao resto do continente por uma estrada, tendo constituído um contributo para a compreensão da epidemiologia do parasita na região.

Palavras – Chave: leishmaniose; gato; zoonose; Ilha de Faro; flebótomos.

Abstract

Leishmaniosis is one of the most important parasitic diseases in Portugal. Although the dog is considered the main reservoir, it has been observed an increase in the prevalence of leishmaniosis in the cat population. Feline leishmaniosis is caused by a protozoan of the genus *Leishmania*. The most common species in cats is *Leishmania infantum* and, to this date, it's the only species that affects cats in Portugal. Transmission occurs through a vector insect genus *Phlebotomus*, which, when infected, can transmit the disease to a vertebrate host, during its blood meal.

The main objective of this work was to evaluate the presence of infection by *Leishmania* spp. in a stray cat colony that lives in Ilha de Faro, through indirect immunofluorescence assay and PCR techniques.

The studied population consisted of 123 cats. Peripheral blood was collected to search for antibodies anti-*Leishmania infantum* by indirect immunofluorescence and parasite DNA from full blood by Polymerase Chain Reaction.

All samples analyzed were negative for both techniques.

The development of this project was important because, to the author's knowledge, it was the only one made on a peninsula, with no access to the mainland except by a road, and contributed to a better understanding of the parasite's epidemiology in the region.

Keywords: leishmaniosis; cat; zoonosis; Ilha de Faro; *Phlebotomus*.

Índice de abreviaturas, siglas e símbolos

% - Percentagem

° - Graus Celcius

> - Superior

ATP –Adenosina Trifosfato

BID – Duas vezes por dia, da locução latina “ *Bis in die*”

CD – Complemento diferenciador

CD4+ - Grupamento de diferenciação, do inglês “Cluster of differentiation”

CIE – Contraimunoeletroforese

CR – Complemento recetor

DAT – Teste de aglutinação direta, do inglês “Direct Test”

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic Acid”

dNTP´s – Desoxirribonucleósidos trifosfato, do inglês “Deoxyribonucleoside triphosphates”

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – Ensaio imunoenzimático, do inglês “Enzyme-Linked Immunossorbent Assay”

Et al. – E outros, abreviatura do latim “*et alli*”

E.U.A – Estados Unidos da América

FelV – Vírus da leucemia felina, do inglês “ Feline Leukemia Vírus”

fGUSB – Gene da β -glucoronidase felina, do inglês “Beta-glucuronidase”

FIV – Vírus da imunodeficiência felina, do inglês “ Feline Immunodeficiency Vírus”

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

G – Gauge

g - grama

GIPLs - Glicoinositolfosfolípidos

GP63 – Glutathiona peroxidase

IFI – Imunofluorescência indireta

IFN - γ – Interferão gama

IgG – Imunoglobulina G

IL12 – Interleucina 12

IM – Intramuscular

IV – Intravenoso

Kg - Kilograma

Km – Quilómetros

LC – Leishmaniose cutânea

Lcan – Leishmaniose canina

Lfel – Leishmaniose felina

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LPG - Lipofosfoglicano

LV – Leishmaniose visceral

m – Metro

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

m/v – Massa/volume

pb – Par de bases

PBS – Tampão fosfato salino, do inglês “ Phosphate Buffered Saline”

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “Polimerase Chain Reaction”

pH – Potencial de Hidrogénio

μ mol - Picomole

PIF – Peritonite Infeciosa Felina

P.O. – Via oral, da locução latina “*Per os*”

pp. – Páginas

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês “ Ribonucleic Acid”

Sc – Subcutânea

SID – Uma vez por dia, da locução latina “*semel in die*”

TBE – Tris-borato-EDTA

TCD4+ – Linfócitos T auxiliares

TH – Células T auxiliares

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa, do inglês “ Tumor Necrosis Factor Alpha”

U - Unidades

ULHT – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

UV - Ultravioleta

V - Volt

μ L – Microlitro

μ m - Micrómetro

x g – Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)

Índice geral	Páginas
1. Relatório de estágio.....	13
2. Introdução	18
2.1 Taxonomia	19
2.2 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	20
2.3 Hospedeiro invertebrado	22
2.4 Papel dos ectoparasitas.....	24
2.5 Hospedeiros vertebrados.....	24
2.6 Leishmaniose humana	25
2.7 Leishmaniose em cães	26
2.8 Leishmaniose em gatos.....	26
2.9 Fisiopatologia	28
2.10 Sinais clínicos.....	30
2.11 Alterações hematológicas e bioquímicas.....	31
2.12 Diagnóstico	32
2.12.1 Diagnóstico parasitológico	32
2.12.2 Diagnóstico molecular	33
2.12.3 Diagnóstico serológico	34
2.13 Tratamento	35
2.14 Prognóstico.....	37
2.15 Profilaxia	37
2.16 Objetivos	39
3. Material e Métodos	40
3.1 População em estudo	40
3.2 Recolha de amostras	40
3.3 Deteção laboratorial de anticorpos anti- <i>Leishmania infantum</i> por IFI	41
3.4 Extração de DNA genómico a partir de sangue total.....	43

3.5 Avaliação da integridade física do DNA extraído	44
3.6 Amplificação, por PCR, de um fragmento do gene beta-glucoronidase felina	45
3.7.1 Visualização dos produtos amplificados por PCR.....	46
3.8 Detecção de DNA de <i>Leishmania donovani s.l.</i> através da técnica de PCR	47
3.8.1 Visualização dos produtos amplificados por PCR.....	49
3.9 Análise estatística	49
4. Resultados	49
4.1 Estatística descritiva.....	49
4.2 Resultados laboratoriais	52
4.2.1 Pesquisa de anticorpos por IFI.....	53
4.2.2 Avaliação da integridade física do DNA genómico	53
4.2.3 Amplificação, por PCR, de um fragmento do gene <i>fGUSB</i>	53
4.2.4 Amplificação, por PCR, de DNA de <i>Leishmania donovani s.l.</i>	54
5. Discussão de resultados.....	54
6. Conclusão	58
7. Referências Bibliográficas	59
8. Apêndice I	I

Índice de Tabelas

Páginas

Tabela 1 - Procedimentos médicos realizados em animais internados, durante o estágio...13	13
Tabela 2 - Cirurgias do aparelho reprodutivo assistidas durante o estágio..... 14	14
Tabela 3 - Cirurgias do aparelho ortopédico assistidas durante o estágio..... 14	14
Tabela 4 – Procedimentos e cirurgias na área de estomatologia e gastroenterologia assistidas durante o estágio. 15	15
Tabela 5 - Cirurgias na área de oftalmologia assistidas durante o estágio. 15	15
Tabela 6 - Cirurgias variadas assistidas durante o estágio. 15	15
Tabela 7 - Algumas espécies de <i>Leishmania</i> e suas características (Adaptado de Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2013)..... 20	20
Tabela 8 - Sequência de primers utilizados na amplificação do gene <i>fgUSB</i> 46	46
Tabela 9 - Condições da reação de PCR na amplificação de <i>fgUSB</i> 46	46
Tabela 10 - Sequência dos <i>primers</i> MC1 e MC2..... 48	48
Tabela 11 - Condições da reação de amplificação de <i>Leishmania donovani s.l.</i> 48	48

Índice de figuras

Páginas

Figura 1 - Divisão percentual das áreas cirúrgicas realizadas durante o estágio.....	16
Figura 2 - Ciclo de vida da <i>Leishmania infantum</i> (Garrido, 2012)	21
Figura 3 - Formas amastigotas, intra e extracelulares, num esfregaço corado por Giemsa (Ramos, 2012)	22
Figura 4 - Gato com leishmaniose felina. (Original de Alexandra Basso ³⁷ ; Pereira da Fonseca, 2013).	31
Figura 5 - Macrófago parasitado com amastigotas corado com Giemsa (1000x) (Adaptado de Gontijo, 2003).	33
Figura 6 - Fotografia de um resultado de IFI.....	43
Figura 7 - Identificação do cinetoplasto num organismo do género <i>Leishmania</i> (http://www.leishrisk.net/leishrisk/Default.aspx?Menu=MenuMain&MIID=34&WPID=40&L=E)	48
Figura 8 - Distribuição da amostra populacional por género.....	50
Figura 9 - Distribuição da amostra populacional por faixa etária.....	50
Figura 10 - Presença de pulgas na amostra populacional.	51
Figura 11 - Presença de diferentes sinais clínicos na amostra populacional.....	52
Figura 13 - Resultado de amplificação, por PCR, do gene <i>fGUSB</i>	54
Figura 14 - Visualização de produtos de PCR para <i>Leishmania donovani s.l.</i> , de algumas amostras.....	54

1. Relatório de estágio

O estágio da autora foi dividido em duas partes distintas: uma realizada em clínica de pequenos animais e outra em laboratório de investigação.

O estágio em clínica foi realizado na clínica Veterinária Linda-a-Vet, no período compreendido entre 7 de Setembro de 2015 a 9 de Janeiro de 2016. O horário coincidia com as horas de atendimento ao público, de segunda a sábado. A Linda-a-Vet atende duas espécies: cão e gato.

Completamente integrada na equipa, foi possível desenvolver um trabalho bastante orientativo. Na parte da manhã realizavam-se os controlos médicos e exames complementares aos internados (tabela 1) e as cirurgias programadas; na parte da tarde realizavam-se as consultas. Para além dos procedimentos cirúrgicos, também foi possível realizar alguns projetos dos quais uma lista de procedimentos cirúrgicos, uma lista de procedimentos que devem ser realizados na primeira consulta e um quadro informativo de desparasitantes que estão, atualmente, a ser aplicados. A autora teve a oportunidade de escrever pequenos textos na área de Medicina Veterinária para a nova página da internet que a clínica irá implementar. As atividades médico-veterinárias realizadas pela autora foram feitas de forma autónoma, sempre acompanhada por veterinários presentes.

Tabela 1 - Procedimentos médicos realizados em animais internados, durante o estágio

Raio-x
Ecografia
Algaliação
Recolha de sangue
Entubação
Administrações medicamentosas (P.O;IM;IV;SC)
Canulação
Hemograma
Bioquímicas
Medição de pressão arterial
Urianálise
Lavagens abdominais com soro estéril
Drenagem de líquido pulmonar
Esfregaços sanguíneos
Observações microscópicas
Consultas ao domicílio
Pensos de Robert-Jones

Eletrocardiograma
Endoscopia
Biopsias
Drenagem de líquido prostático
Punção de linfonodos
Coloração de lâminas
Sessões de quimioterapia

P.O: "Per os"; IM – intramuscular; IV – intravenoso; SC - subcutâneo

As cirurgias assistidas estão resumidas nos quadros explicativos que se seguem (tabela 2 a 6, figura 1).

Tabela 2- Cirurgias do aparelho reprodutivo assistidas durante o estágio.

Tipo de cirurgia	Número de cirurgias	Espécie
Castrações	17	cão e gato
Ovariohisterectomia	23	cão e gato

Tabela 3 - Cirurgias do aparelho ortopédico assistidas durante o estágio.

Tipo de cirurgia	Número de cirurgias	Espécie
Dartoplastia	1	cão
Fixação e redução de fratura da epífise da cabeça do fêmur direita	1	cão
Amputação de membro/dedo	2	cão e gato
Remoção de cavilha de fêmur	2	cão

Tabela 4 – Procedimentos e cirurgias na área de estomatologia e gastroenterologia assistidas durante o estágio.

Tipo de cirurgia	Número de cirurgias	Espécie
Destartarização	9	cão e gato
Remoção de abscesso bucal	1	cão
Introdução de tubo gástrico por acesso esofágico	1	gato

Tabela 5 - Cirurgias na área de oftalmologia assistidas durante o estágio.

Tipo de cirurgia	Número de cirurgias	Espécie
Cirurgia corretiva de prolapso da terceira palpebra	1	cão
Enucleação	1	gato

Tabela 6 - Cirurgias variadas assistidas durante o estágio.

Tipo de cirurgia	Número de cirurgias	Espécie
Sutura de mordida com colocação de dreno	1	Cão
Laparotomia exploratória	2	Cão
Esplenectomia	3	Cão
Resolução de rutura de bexiga	1	Gato
Abertura de Flap na pele	1	Cão
Remoção de sarcoma de tecidos moles	1	Cão
Resolução de hérnia perineal	1	Cão

Exerese de nódulos	2	Cão
Tiroidectomia	2	Cão
Mastectomia	2	Cão e gato
Resolução de hérnia umbilical	1	Cão
Remoção de massas	2	Cão e gato

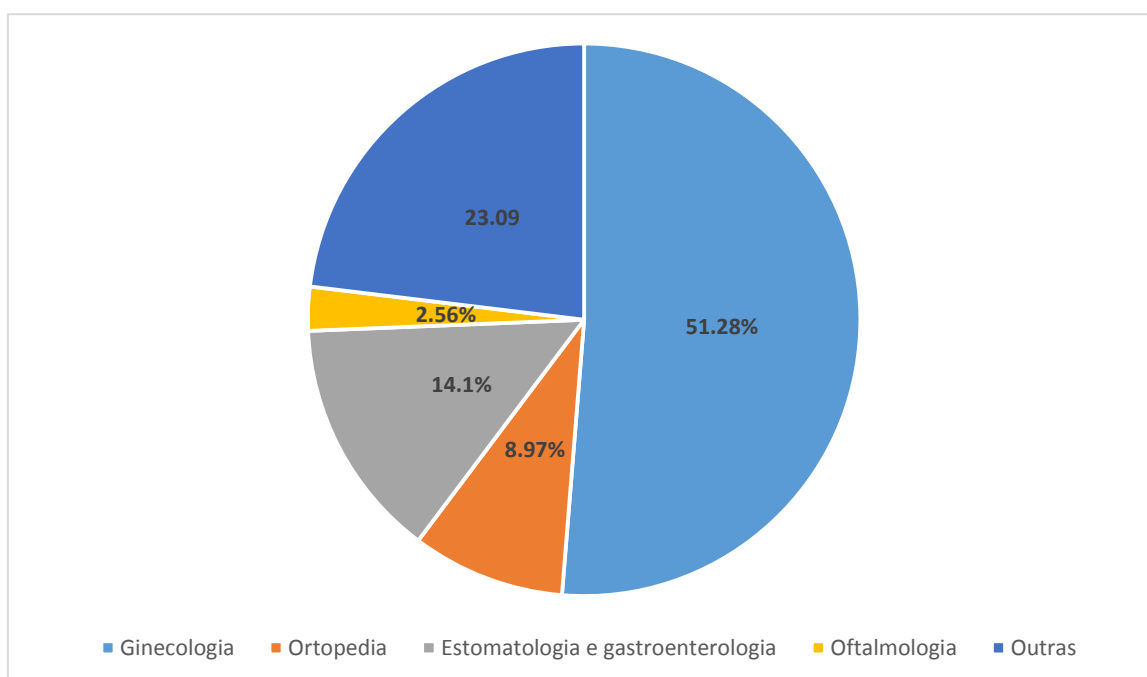


Figura 1 - Divisão percentual das áreas cirúrgicas assistidas durante o estágio.

Diariamente, a autora assistia a consultas dos quatro veterinários pertencentes à equipa, em média, assistia a 4 a 5 consultas por dia que decorriam durante a tarde. Essas consultas podiam ser de qualquer área. Porém, sempre que necessário, realizaram-se consultas com veterinários especializados em áreas específicas, nomeadamente oftalmologia, comportamento e ecografia (que incluía ecocardiografia, ecografia abdominal, torácica e tiroideia). Durante as consultas a autora auxiliava em várias atividades que estão descritas abaixo:

- Contenção
- Administração de fármacos
- Vacinação
- Colocação de um microchip

- Registo dos animais no SIRA
- Exames físicos completos
- Registo de historiais clínicos
- Urianálise (observação da densidade de urina, tira de urianálise, preparação de gota fresca e centrifugação do sedimento com visualização em microscópio)
- Raspagens
- Colheitas de sangue, armazenamento e posterior processamento nos aparelhos específicos (bioquímicas, hemograma e preparado para envio adequado para Laboratório)

O estágio realizado em laboratório de investigação decorreu entre 10 de Janeiro e 10 de Março no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da FMV-ULHT. O trabalho consistiu na elaboração prática da presente dissertação que incluía a identificação, por imunofluorescência indireta, de anticorpos anti-*Leishmania infantum* no soro de 123 gatos errantes da ilha de Faro e a deteção molecular de *Leishmania donovani* s.l. por PCR.

2. Introdução

O parasita responsável pela leishmaniose foi identificado no século XIX por Cunnigham, Leishman, Borovsky, Donovan, Wright, Linderberg e Vianna. Posteriormente, Ronald Ross atribuiu-lhe o nome de *Leishmania*. Em 1908, Nicolle e Comte atribuíram o nome de *Leishmania infantum* e cultivaram-no em laboratório, pela primeira vez (Solano-Gallego *et al.*, 2013).

A infeção por *Leishmania* em gatos (*Felis catus domesticus*) já foi descrita em vários países. A primeira descrição foi em 1912, na Argélia, num gato que coabitava com um cão e uma criança, ambos com leishmaniose visceral. As formas amastigotas foram observadas na medula óssea do gato.

O primeiro caso em cães a ser descrito em Portugal foi em 1910 (Ayllon *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010;). O primeiro caso descrito em gatos, em Portugal, foi em Sesimbra, em 1994, tendo sido observados amastigotas em lesões do nodulares (Maia *et al.*, 2008; Pereira da Fonseca *et al.*, 2013). Na última década, em países endémicos para o parasita, têm vindo a ser descritos com maior frequência, casos clínicos de leishmaniose felina e tem sido detetado um aumento da sua incidência no gato doméstico (Rougeron *et al.*, 2011; Pinto, 2013).

Nos últimos anos, os animais de companhia têm beneficiado das alterações socioeconómicas e do aumento dos cuidados médico-veterinários preventivos e gerais, o que lhes permite alcançar uma longevidade que dificilmente alcançariam anteriormente. Cães e gatos têm, hoje, um papel social muito importante não sendo apenas animais de companhia, mas sim elementos da família. Todavia, o abandono animal continua a existir, bem como a alimentação de populações de animais errantes que, ao não receberem quaisquer cuidados médico-veterinários, podem tornar-se reservatórios e disseminadores de agentes etiológicos de algumas doenças (Pinto, 2013; Pennisi, 2014).

A leishmaniose é uma das parasitoses mais importantes em Portugal, sendo uma zoonose endémica em, pelo menos, 88 Países (Chatzis *et al.*, 2014). Entre as zonas endémicas para este parasita encontram-se o Brasil e países mediterrânicos, onde se inclui Portugal, Espanha, França, Itália, Grécia, Israel e Palestina. Em Portugal as zonas com maior presença de leishmaniose canina são Trás-os-Montes e Alto Douro, a sub-região da Cova da Beira, o concelho da Lousã, a região de Lisboa e Setúbal, o concelho de Évora e o Algarve (Cardoso *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2010; Onleish, 2009).

O agente responsável pela leishmaniose canina nos países da bacia mediterrânica, Médio Oriente e Portugal é *Leishmania infantum*. *Leishmania chagasi* distribui-se pela América Central e América do Sul (Pereira da Fonseca *et al.*, 2013). Inicialmente, as espécies *L. chagasi* e *L. infantum* foram consideradas espécies

diferentes; no entanto, após análise genética de estirpes de ambas as espécies, verificou-se que eram uma só (Maia, comunicação pessoal).

Em gatos, as doenças causadas por vetores têm emergido, mostrando, cada vez mais, uma maior distribuição geográfica e aumento da incidência global. Nos últimos anos, na União Europeia, a população animal tem aumentado e os cuidados e condições prestados aos animais têm vindo a melhorar significativamente. O número de gatos é superior ao de cães, vivendo os primeiros, em, pelo menos, 70 milhões de habitações (Pennisi, 2014).

A presença de uma larga variante de espécies não convencionais, incluindo pequenos mamíferos que ganharam popularidade devido ao pequeno tamanho e custos reduzidos, aumentou, também, o número de espécies reservatórias capazes de transmitir doença (Pennisi, 2014).

Fatores ambientais, geográficos e humanos, como viajar com animais, em conjunto com as bruscas alterações climáticas e a capacidade de distribuição geográfica do vetor, contribuíram para alterações epidemiológicas de doenças causadas por vetores (Maia *et al.*, 2014a).

Segundo Pennisi *et al* (2013), a percentagem de animais infetados é muito superior à percentagem de animais com a doença (Pennisi *et al.*, 2013).

A infeção natural dos gatos por *Leishmania* spp. parece ser incomum. A incidência baixa pode ser explicada por casos não descritos e por resistência natural dos gatos à infeção (Ayllon *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010).

2.1 Taxonomia

O género *Leishmania* pertence ao Filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e compreende 21 espécies que se encontram distribuídas por quatro continentes (tabela 7). O género *Leishmania* dá origem aos subgéneros *Leishmania* e *Viannia* que diferem no desenvolvimento no vetor. Ao primeiro pertencem as espécies *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. major*, o complexo *L. donovani* e o complexo *L. mexicana*. O subgénero *Viannia* é representado por quatro espécies principais: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana* (Garrido, 2012; Longoni *et al.*, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Algumas espécies de *Leishmania* e suas características (Adaptado de Solano-Gallego et al., 2013)

Espécie de <i>Leishmania</i>	Apresentação clínica	Região	Principais regiões geográficas
<i>L. infantum</i>	Forma visceral e forma cutânea	Velho Mundo	Países da bacia mediterrânea (Europa, Norte de África e Médio Oriente) e China
	Forma visceral e forma cutânea	Novo Mundo	Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Paraguai, República do Suriname e Venezuela
<i>L. donovani</i>	Forma visceral	Velho Mundo	Este de África (Etiópia, Quênia e Sudão) Bangladesh, Índia
<i>L. major</i>	Forma cutânea	Velho Mundo	Norte de África, Quênia e Médio Oriente
<i>L. tropica</i>	Forma visceral e forma cutânea	Velho Mundo	Norte de África, Grécia, Índia, Médio Oriente
<i>L. aethiopica</i>	Forma cutânea	Velho Mundo	Etiópia e Quênia
Complexo <i>L. braziliensis</i>	Forma cutânea e mucocutânea	Novo Mundo	América Central e América do Sul
Complexo <i>L. mexicana</i>	Forma cutânea	Novo Mundo	América Central e região de Amazonas
Complexo <i>L. guyanensis</i>	Forma cutânea e mucocutânea	Novo Mundo	América Central e América do Sul

2.2 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

A leishmaniose é causada por protozoários difásicos do género *Leishmania*. (Garrido, 2012). Estes parasitas são caracterizados pela presença celular de um organelo de DNA mitocondrial, o cinetoplasto, localizado anteriormente ao flagelo. Este último confere motilidade à forma promastigota e amastigota que, embora seja rudimentar, desempenha um papel na organização e/ou percepção sensorial do parasita. As leishmanias são caracterizadas por três tipos morfológicos diferentes: amastigota, promastigota e paramastigota, este último é considerado um estágio transitório entre os dois tipos morfológicos anteriores (Trainor et al., 2010; Pereira da Fonseca et al., 2013).

O ciclo inicia-se quando a fêmea flebótomo ingere uma refeição de sangue de um hospedeiro vertebrado infetado, que contém formas amastigotas do parasita. A forma amastigota é caracterizada por um corpo arredondado de 2 a 6 µm de comprimento e um flagelo ausente/intracelular. Nas primeiras 24 a 48 horas após a refeição, as formas amastigotas evoluem para formas promastigotas procíclicas dando-se início à primeira multiplicação parasitária intravetorial. Ao fim de 48 a 72 horas, as formas procíclicas transformam-se em formas nectomonas que migram da região posterior para a região

anterior do intestino médio, o que impede a sua eliminação pelo intestino posterior. Quatro a sete dias mais tarde, desenvolvem-se as formas leptomonas que sofrem a segunda multiplicação intravetorial; na válvula estemodeal observam-se as formas haptomonas que, ao se fixarem à válvula estemodeal, provocam a degenerescência da mesma, permitindo que as formas promastigotas metacíclicas atinjam a cavidade oral. Estas atingem a cavidade oral (probóscide) sob a forma infetante que vai ser injetada na pele do hospedeiro vertebrado (figura 2) (Garrido, 2012; Pereira da Fonseca *et al.*, 2013).

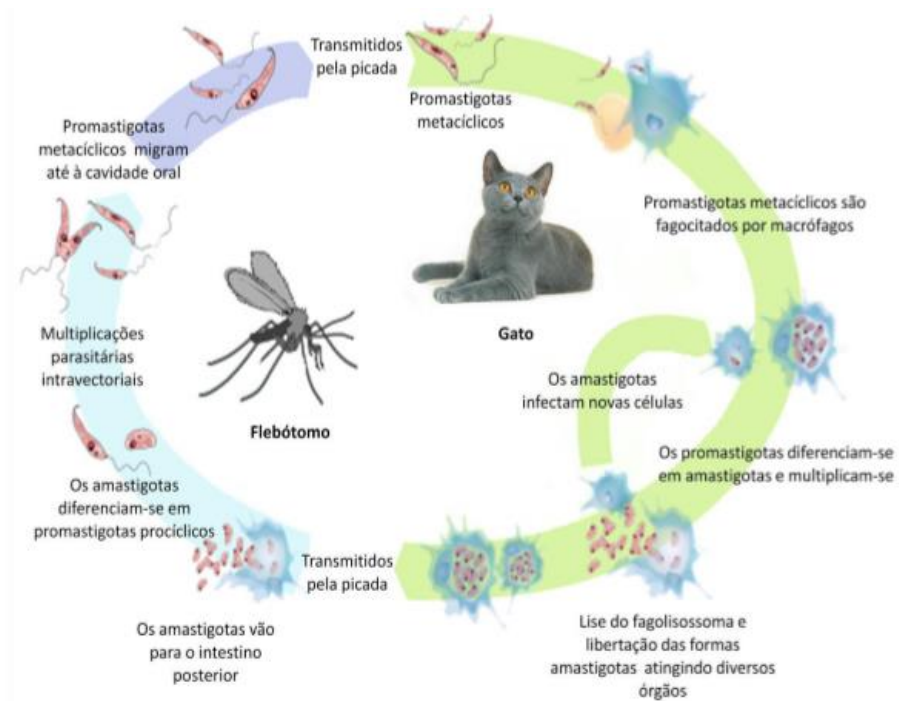


Figura 2 - Ciclo de vida da *Leishmania infantum* (Garrido, 2012).

A forma promastigota tem formas móveis com 10-20µm de comprimento e 1,5-3,0 µm de largura (Figura 3), sendo caracterizada por um corpo fusiforme sem membrana ondulante e um longo flagelo. O núcleo encontra-se numa posição central e o cinetoplasto localiza-se entre o núcleo e a extremidade anterior da célula. Estes parasitas promovem, ainda, a oclusão do lúmen intestinal do inseto, obrigando-o a realizar um maior número de refeições até atingir a repleção total, o que parece contribuir para uma maior disseminação do parasita (Pereira da Fonseca *et al.*, 2013).

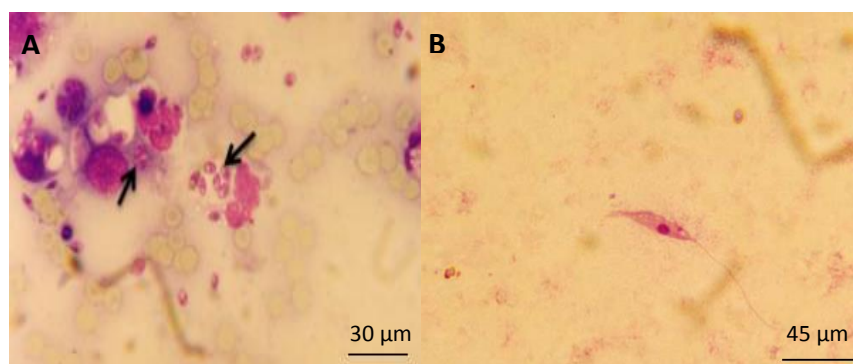


Figura 3 - Formas amastigotas, intra e extracelulares, num esfregaço corado por Giemsa (setas). Forma promastigota corada com Giemsa. (Ramos, 2012)

Após a infeção do hospedeiro, os promastigotas são fagocitados pelos neutrófilos que foram rapidamente, recrutados para a zona de mordedura. Os neutrófilos infetados libertam os parasitas que são, posteriormente, fagocitados pelos macrófagos onde os promastigotas se transformam em amastigotas (esta é a fase a partir da qual o diagnóstico é possível). Os amastigotas sobrevivem e replicam-se intracelularmente nos vacúolos dos macrófagos e em vários tecidos. O flebótomo, ao realizar a refeição sanguínea, ingere os macrófagos infetados com amastigotas iniciando-se um novo ciclo (Pennisi *et al.*, 2013; Miró *et al.*, 2014).

O papel do gato na transmissão e ciclo da leishmaniose não se encontra, ainda, bem esclarecido, sendo necessários mais estudos que contribuam para a sua melhor compreensão (Pennisi, 2013; Miró *et al.*, 2014).

2.3 Hospedeiro invertebrado

Os insetos responsáveis pela transmissão de *Leishmania* spp. pertencem à ordem Diptera, sub-ordem Nematocera, família Psychodidae e aos géneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e o *Lutzomyia* spp. no Novo Mundo. Das cinco espécies de flebótomos atualmente conhecidas em Portugal (*P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. sergente* e

Sergentomya minuta), destacam-se *P. perniciosus* e *P. ariasi*, por serem as principais responsáveis pela transmissão de *Leishmania infantum* (Pereira da Fonseca *et al.*, 2013).

Estas duas espécies possuem tipos de evolução sazonal distintos. *P. ariasi* possui um ciclo difásico com dois picos de eclosões em Junho e Setembro. *P. perniciosus* possui um ciclo monofásico com apenas um pico de eclosão, em Julho (Garrido, 2012).

Morfológicamente, os flebótomos são dípteros de pequenas dimensões, com um comprimento corporal inferior a 3 mm. Têm a cobrir o corpo, incluindo patas e asas, uma densa pilosidade e apresentam uma coloração amarela clara. Têm patas longas e uma armadura bucal picadora tão longa como a cabeça. Quando em repouso, as asas fazem um ângulo de 45° com o abdómen. Apresentam características comportamentais típicas, tais como atacar silenciosamente, rondar o hospedeiro antes de se fixar para se alimentar e encontrarem-se, normalmente, junto aos locais de alimentação, pois não apresentam grandes capacidades de voo (conseguem voar distâncias entre os 200 m e 2,5Km) (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Garrido, 2012).

Os vetores vivem perto do solo, em zonas sem vento e chuva e com elevada humidade (> 80%). Vivem em ambientes com temperaturas entre os 20°C e 30°C e a sua alimentação ocorre no período crepuscular e noturno. A época de atividade é, predominantemente, entre Maio e Outubro (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2010; Pereira da Fonseca *et al.*, 2013; Pinto, 2013; Rennó *et al.*, 2014;).

Os insetos alimentam-se de fontes naturais de açúcar e secreções de outros insetos. Apenas as fêmeas são hematófagas sendo, portanto, as únicas capazes de transmitir a doença. A alimentação hematófaga proporciona-lhes uma nutrição adequada para a produção e maturação dos ovos. As fêmeas têm um aparelho bucal sugador que possui ductos salivares responsáveis pela síntese de saliva rica em biomoléculas ativas, com capacidade de facilitar a implantação de *Leishmania* spp. nos reservatórios. Assim, quando a fêmea se alimenta, cria inicialmente um microhematoma no hospedeiro vertebrado do qual o sangue é sugado, contrariamente aos mosquitos que sugam diretamente dos capilares sanguíneos (Afonso & Alves-Pires, 2008).

O ciclo de vida do flebótomo é constituído por duas fases, uma em meio aéreo, onde estão presentes os adultos, e outra terrestre onde os ovos, os quatro estádios larvares e as pupas, se desenvolvem de forma livre. Estes insetos são holometabólicos, o que significa que apresentam metamorfoses completas. A duração do ciclo de vida varia consoante a temperatura, humidade e fotoperíodo (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Apesar da transmissão através do vetor ser tipicamente a mais comum, também já foi registada transmissão vertical, transmissão através de transfusões sanguíneas, agulhas contaminadas e transmissão venérea (Morais *et al.*, 2012).

Estudos recentes indicam que outros artrópodes também podem estar

envolvidos na transmissão de *Leishmania* spp. (Morais *et al.*, 2012).

2.4 Papel dos ectoparasitas

O papel exato dos ectoparasitas, como *Rhipicephalus sanguineus* e *Ctenocephalides felis*, na transmissão de *Leishmania infantum* em cães, ainda não se encontra bem definido. Já foi detetada uma carraça *Rhipicephalus sanguineus* naturalmente infetada com *Leishmania infantum*. Esta, em condições experimentais, foi capaz de transmitir a doença a roedores. A importância deste possível modo de transmissão secundário é incerta, desconhecendo-se, atualmente, se *R. sanguineus* é capaz de transmitir a doença, durante uma refeição sanguínea (Morais *et al.*, 2012).

Estes métodos alternativos de transmissão direta foram sugeridos numa tentativa de explicar a propagação da infeção em canis, nos Estados Unidos da América (EUA), onde o flebótomo não estava presente (Pennisi *et al.*, 2013; Salvatore *et al.*, 2014).

2.5 Hospedeiro vertebrado

A Leishmaniose afeta, principalmente, cães como hospedeiro principal mas, também, pode afetar gatos, cavalos, lobos, raposas e, ainda, o Homem (Garrido, 2012).

O envolvimento de outras espécies hospedeiras na epidemiologia da leishmaniose deve ser considerado, particularmente, em zonas geográficas onde a doença é endémica. Os gatos são, frequentemente, encontrados infetados com *Leishmania* spp.. Tem sido demonstrado que o facto de os gatos poderem ser infetados, permite que atuem na transmissão do parasita, como hospedeiro vertebrado, a vetores competentes (Maroli *et al.*, 2007).

Todavia, o papel dos gatos como reservatório ainda não se encontra bem definido e a sua suscetibilidade à infeção continua a ser mal compreendida. Anteriormente, o gato era considerado um hospedeiro acidental; porém, atualmente, está a ser considerado como um hospedeiro alternativo ou secundário porque, não só transmite o parasita a um vetor competente, como também pode desenvolver a doença (Maia *et al.* 2010; Ramos, 2012).

Um hospedeiro pode ser considerado um reservatório se não for capaz de eliminar o parasita e se for responsável pela transmissão do mesmo a indivíduos da mesma ou de outra espécie (Pinto, 2013).

O aumento da utilização de inseticidas/repelentes como medida preventiva para leishmaniose em cães, pode estar a aumentar o papel epidemiológico dos gatos como reservatórios para *Leishmania infantum*, uma vez que eles se podem tornar uma das

principais fontes de sangue do flebótomo (Pimenta *et al.*, 2016).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, o parasita multiplica-se nos macrófagos da pele e nos órgãos do sistema Mononuclear Fagocitário, como nódulos linfáticos, medula óssea e baço (Poli *et al.*, 2002).

Também já foi descrita a infecção em animais de pecuária como cabras, vacas, suínos, cavalos, burros e mulas, e em animais silváticos como raposas, lobos, guaxinins, ouriços-cacheiros, ratos, morcegos, texugos, ginetas, lince-Ibérico e saca rabos (Ramos, 2012).

2.6 Leishmaniose humana

A leishmaniose é uma das doenças parasitárias mais importantes a nível mundial, depois da malária e da filariose linfática (Solano-Gallego *et al.*, 2013).

A leishmaniose é considerada uma doença importante mas negligenciada que, nos últimos anos, se tornou um problema grave de saúde pública devido ao seu potencial zoonótico, afetando largamente as populações mundiais mais pobres, com acesso difícil a cuidados médicos. O impacto verdadeiro da leishmaniose na saúde humana ainda não foi classificado. Porém, mundialmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima uma incidência anual de 1 a 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral (World Health Organization [WHO], 2010; Pennisi, 2014).

Durante a última década, têm sido observadas elevadas taxas de incidência de leishmaniose humana. É, no entanto, difícil diferenciar entre um aumento real e artificial devido ao progresso no diagnóstico, aumento da deteção de casos, aumento de casos a serem registados e acessibilidade ao tratamento. Indiscutivelmente, a leishmaniose humana e animal apresentam, atualmente, uma maior distribuição geográfica (Pennisi, 2014).

Em relação à infecção em humanos podem ser definidas duas entidades epidemiológicas:

- leishmaniose zoonótica, em que animais domésticos ou selvagens atuam como reservatório, estão envolvidos no ciclo de transmissão e o homem atua como hospedeiro acidental,
- leishmaniose antroponótica, na qual o homem é o único ou principal reservatório e fonte de infecção para o vetor (Gramiccia, 2011; Rennó *et al.*, 2014).

No homem, a leishmaniose zoonótica pode ser classificada como cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV). Esta última é também designada por “Kala-azar” na

Índia, onde é considerada estritamente uma antroponose. A LV é a que apresenta quadro clínico mais grave, envolve os órgãos internos e pode ser fatal, se não tratada. As LMC e LC afetam a pele ou junções mucocutâneas e as alterações podem resolver-se espontaneamente, deixando cicatrizes desfigurantes (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Estas zoonoses observam-se, principalmente, em crianças e imunodeprimidos. Atualmente, o fármaco de primeira linha utilizado no tratamento da leishmaniose visceral humana na Europa é a anfotericina-B (Kirkpatrick *et al.*, 1984; Gramiccia & Gradoni, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Quinnell & Courtenay, 2009).

2.7 Leishmaniose em cães

Em Medicina Veterinária a leishmaniose causada por *Leishmania infantum* tem maior importância nos cães (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A leishmaniose canina é uma doença multisistémica crónica e muitas vezes fatal, em que o cão atua como hospedeiro principal do parasita e é o principal reservatório da infeção visceral em humanos. A gravidade da doença depende de um equilíbrio entre as células mediadoras e a resposta imune humoral. O período de incubação é longo, podendo variar de meses a anos. As lesões mais comuns acontecem na pele e rins, embora qualquer tecido ou órgão possa, em princípio, ser afetado (Nieto *et al.*, 1996; Pennisi *et al.*, 2013).

Os mecanismos de resposta em casos de resistência e suscetibilidade não estão bem estabelecidos. Também não está provada a relação entre fatores de risco como a idade, sexo, nutrição, fatores genéticos, condições imunossupressoras e a variabilidade de manifestações clínicas em infeção por *Leishmania spp.* Algumas raças de cães como Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e Pastor Alemão parecem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença. O gene *Solute carrier family 11 member 1* (Slc11c1) anteriormente chamado *N-RAMPI* e os alelos dos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHCII, do inglês “major histocompatibility complex II”) parecem estar associados a suscetibilidade à leishmaniose canina. Em relação à idade, observam-se dois picos principais de prevalência da doença: cães com menos de três anos e com mais de oito anos. O macho parece, também, ter mais suscetibilidade que a fêmea (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Paltrinieri *et al.*, 2010).

2.8 Leishmaniose em gatos

A leishmaniose é uma doença crónica de evolução lenta e progressiva em que o gato pode, ou não, apresentar sinais clínicos, sendo, frequentemente, assintomático. Em Portugal a leishmaniose felina é causada por *Leishmania infantum*, pertencente ao

complexo donovani. Com o aumento dos casos descritos de leishmaniose felina aumenta, também, a suspeita do gato ser um potencial hospedeiro no ciclo doméstico de *Leishmania infantum*. Para o gato ser incluído no ciclo biológico do parasita, tem de apresentar algumas características, como ser naturalmente suscetível à infecção por *Leishmania infantum*, normalmente com ausência de sinais clínicos, ser considerado uma fonte de alimentação sanguínea a vetores biológicos competentes, conter um número suficiente de parasitas que possa ser transmitido e infetar os vetores, e ser, como os cães, um dos animais mais comuns presente em áreas endémicas (Giudice & Marty, 2003; Maia & Campino, 2011).

O maior número de casos de leishmaniose felina tem ocorrido em zonas endémicas; porém, mesmo nessas zonas, a prevalência é, regra geral, baixa, o que pode ser explicado por uma possível resistência natural do gato à infecção (Ramos, 2012).

Embora a leishmaniose em gatos seja considerada uma doença rara, tem vindo a observar-se um aumento do número de casos de infecção descritos na população felina, seja pelo aumento dos casos registados ou outros fatores (Ramos, 2012).

Numa mesma região, regra geral, a prevalência de anticorpos na população felina é mais baixa do que na população canina. Esta observação confirma o papel primário dos cães como reservatório (Solano-Gallego *et al.*, 2013).

A identificação de infecção natural através da deteção de anticorpos, isolamento do agente infeccioso ou deteção do DNA do parasita, é um dos critérios que devem ser obedecidos para definir um reservatório para o hospedeiro. Em diferentes zonas geográficas, vários estudos serológicos foram realizados em gatos, para detetar anticorpos anti-*Leishmania*, tendo sido descritas prevalências entre 0,6% e 59%. Porém, na maioria dos estudos não se detetaram anticorpos anti-*Leishmania* spp. específicos ou detetaram-se em doses muito baixas, sugerindo que a serologia possa não ser a melhor técnica de diagnóstico. A deteção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. só indica que o animal esteve exposto à infecção e não que apresenta a doença. Gatos seropositivos para *Leishmania infantum* em zonas endémicas têm menos probabilidades de desenvolver doença, quando comparados com cães, o que sugere que a imunidade celular em gatos é mais competente do que nos cães no controlo da doença (Maia & Campino, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012).

O isolamento em cultura dos parasitas e/ou a deteção do seu DNA em tecidos infetados é um melhor indicador das espécies que podem atuar como reservatório para o hospedeiro. A prevalência de infecção por *Leishmania* spp. em gatos, determinada por métodos parasitológicos como cultura de parasitas, microscopia direta, amplificação de DNA, identificação histopatológica e imunohistoquímica de amastigotas de *Leishmania* spp. em células fagocitadas mononucleares de órgãos linfóides, pele e sangue periférico

pode variar entre 0,43% e 61%. Estes resultados demonstram que o protozoário pode colonizar gatos que vivem em zonas endêmicas (Maia & Campino, 2011).

Gatos dadores de sangue sem sinais clínicos e sem alterações clinico-patológicas compatíveis com leishmaniose devem ser testados para o parasita, uma vez que já foi demonstrada transmissão da infecção através sangue, em cães e no homem (Pennisi *et al.*, 2015).

A relação de positividade entre doenças infecciosas como o vírus da imunodeficiência felina (FIV, do inglês “Feline Immunodeficiency Virus”), vírus da leucemia felina (FeLV, do inglês “Feline Leukemia Virus”), peritonite infecciosa felina (PIF) e a leishmaniose não está, ainda, bem definida. Alguns estudos não demonstraram qualquer tipo de relação entre gatos positivos para *Leishmania* spp. e a co-infecção com agentes imunossupressores (Maia *et al.*, 2010).

Outros autores observaram uma relação significativa entre a sero-reatividade anti-FIV e anti-*Leishmania* spp.. A alteração da imunocompetência devida a uma infecção retroviral é considerada, geralmente, um fator de risco que predispõe à infecção por *Leishmania* spp. em gatos. A maior parte dos gatos que desenvolvem sinais clínicos são suspeitos de ter um sistema imunitário comprometido devido a FIV, FeLV, carcinoma das células escamosas, diabetes *mellitus*, doenças autoimunes como *Penphigus foliaceus* e o tratamento com corticosteróides ou outros fármacos imunossupressores (Solano-Gallego *et al.*, 2013; Pennisi *et al.*, 2013).

Alguns comportamentos do gato podem ajudar na disseminação da Leishmaniose como, por exemplo, a atividade predatória noturna e o facto de terem acesso constante à rua (Rennó *et al.*, 2014).

2.9 Fisiopatologia

Para que a infecção por *Leishmania* spp. ocorra são necessários três intervenientes: o agente infeccioso, o vetor e o hospedeiro vertebrado. A expressão clínica da doença depende da localização do parasita, estando diretamente ligada ao tropismo da espécie em causa, assim como ao estado imunológico do hospedeiro. Em condições naturais, os flebótomos transmitem entre 100 a 1000 formas promastigotas por refeição sanguínea, um número capaz de induzir doença em animais suscetíveis. Contudo, a maioria dos parasitas são mortos por fatores de complemento do hospedeiro vertebrado, levando à necessidade das leishmanias desenvolverem algumas estratégias de sobrevivência. Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas aderem rapidamente às células do sistema mononuclear fagocitário, sendo os recetores mais importantes para esta aderência os do complemento tipo I [complemento recetor um

(CR1) e complemento diferenciador 35 (CD35)] e tipo III [complemento recetor três (CR3) e complemento diferenciador 11b/complemento diferenciador 18 (CD11b/CD18)], que permitem a ligação à membrana plasmática dos parasitas. Seguidamente, tem lugar a fagocitose durante a qual se dá a interiorização do parasita. A sobrevivência da maioria dos parasitas é dificultada pela queda do pH para 4,5-5 dentro do fagolisossoma. Devido, no entanto, às moléculas de superfície que as leishmanias possuem, como lipofosfoglicano (LPG), glutathiona peroxidase (gp63) e glicoinositolfosfolipidos (GIPLs), a sua capacidade de sobrevivência neste meio ácido, rico em proteases, torna-se maior (Faria, 2008; Ramos, 2012).

Esta resposta envolve neutrófilos, eosinófilos e, mais tarde, macrófagos e linfócitos. A presença de macrófagos infetados com leishmanias está, normalmente, associada a uma reação inflamatória. Com a progressão da doença esta inflamação inicial tornar-se-á granulomatosa. Dentro dos macrófagos ocorre a diferenciação para a forma amastigota (Faria, 2008; Pennisi *et al.*, 2013).

A infeção pode localizar-se, sobretudo, a nível cutâneo ou disseminar-se a nível visceral. Em cães, quando ocorre infeção, a resposta humoral protetora vai ser ativada, estimulando os linfócitos B a aumentar a produção de anticorpos. Esta resposta está, frequentemente, associada ao estado de doença, uma vez que os anticorpos não possuem função protetora para o hospedeiro. Apesar de conseguirem induzir a fagocitose, os anticorpos não conseguem causar a morte intracelular das formas amastigotas, comprometendo, assim, o controlo da infeção. A resposta grave por parte dos anticorpos leva à deposição de imunocomplexos nos rins, resultando em glomerulonefrite e conseqüente insuficiência renal (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Pennisi *et al.*, 2013).

Por sua vez, em cães e gatos que desenvolvem uma forte resposta humoral não protetora associada a uma fraca imunidade mediada por células com uma resposta mista de citocinas Th1 e Th2 observa-se o desenvolvimento de infeção clínica (Solano-Gallego, *et al.*, 2009; Maia & Campino, 2012; Baneth, *et al.*, 2008).

As células TCD4+ podem induzir o sistema imunitário a sofrer uma alteração de uma resposta humoral (Th2) para uma resposta mediada por células (Th1). O tipo de resposta imune (Th1 ou Th2) é determinado, sobretudo, pelas citoquinas que contactam primariamente com o antigénio (Faria, 2008). Cães saudáveis são caracterizados por ausência ou uma fraca resposta do tipo Th2 e uma resposta forte do tipo Th1. Em cães doentes observa-se, conseqüentemente, um quadro inverso. Em cães, a resistência à doença parece estar associada à produção de citoquinas do tipo Th1 e a suscetibilidade a uma produção reduzida de citoquinas do tipo Th2 (Paltrinieri *et al.*, 2010).

A produção de citoquinas do tipo Th1 como o interferão gama (IFN- γ),

interleucina 12 (IL- 12) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês “tumor necrosis factor”) vão estimular a morte intracelular das formas amastigotas nos macrófagos e a infecção pode ter, apenas, um quadro sub-clínico. Deste modo, o elemento decisivo no desenvolvimento da suscetibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania* spp. parece ser a capacidade das células TCD4+ manterem o recetor para IL-12 mais do que as 48 horas que se seguem à infecção (Faria, 2008).

O principal mecanismo que ocorre no interior dos macrófagos para destruição dos parasitas é a produção de radicais livres de oxigênio, principalmente o ácido nítrico. Nos gatos, na ausência de agentes imunossupressores, esta resposta imunitária mediada por células pode ser suficiente para controlar a infecção, apoiando, assim, a teoria que os gatos têm uma resistência natural ao protozoário (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Pennisi *et al.*, 2013).

Em gatos, a resistência natural à leishmaniose tem sido sugerida após infecção experimental, em que estes animais demonstraram cura espontânea das lesões; em gatos naturalmente infetados as alterações clínicas e patológicas são mínimas (Navarro *et al.*, 2010)

Existem, ainda, autores que referem que o desenvolvimento da doença é influenciado por fatores imunológicos que estão ligados às características genéticas dos hospedeiros (Pennisi, 2002; Vita, *et al.*, 2005).

2.10 Sinais clínicos

A maior parte dos casos de infecção por *leishmania* spp. em gatos apresenta um quadro assintomático. Em estudos epidemiológicos é frequente detetar cães e gatos com parasitas presentes na circulação sanguínea, sem qualquer sinal de doença (Afonso & Alves-Pires, 2008).

A leishmaniose em gatos tem duas formas clínicas: a visceral e a cutânea. A cutânea parece ser a mais comum; porém, também já foi observada sintomatologia visceral (Ayllon *et al.*, 2008).

Os sinais clínicos comuns num quadro de leishmaniose cutânea são dermatite nodular ou ulcerativa, pustular ou papular, alopecia difusa ou localizada, descamação, eritemas e seborreia (figura 4). Estas alterações observam-se, sobretudo, na região da cabeça (face, pavilhão auricular, nariz, região periocular). Os flebótomos alimentam-se, preferencialmente, nas regiões do corpo que possuem menor quantidade de pelo, sendo, assim, a cabeça uma das zonas mais afetadas. A maior parte dos casos descritos de leishmaniose em gatos ocorreu em gatos de pelo curto (Sherry *et al.*, 2011; Pereira da Fonseca *et al.*, 2013; Pennisi *et al.*, 2013).

A leishmaniose visceral afeta o baço, fígado, linfonodos, medula óssea, olhos e

rins (Schubach *et al.*, 2004; Ramos, 2012).

Quando associada a doenças sistêmicas, a leishmaniose causa sintomatologia inespecífica como perda de peso, diminuição de apetite, desidratação, mucosas pálidas, hepatomegalia, icterícia, caquexia, pirexia, vômitos, diarreia, corrimento nasal crônico, esplenomegalia, poliúria e polidipsia, dispneia, linfadenomegália e abortos (Ayllon *et al.*, 2008; Pereira da Fonseca *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2010). Também já foram descritas erosões e úlceras nas mucosas e junções mucocutâneas e alterações oculares como uveíte, panuveíte, glaucoma, corrimento nasal e ocular e otites (Simões-Mattos, 2005).

As alterações clinicopatológicas registadas são poucas mas, em alguns casos em que os gatos foram acompanhados até à morte ou eutanásia, foi observada na necrópsia doença glomerular e sinais de insuficiência renal crónica (Pennisi *et al.*, 2013).

Nenhum dos sinais clínicos apresentados é patognomónico para a doença e, muitas vezes, podem ser confundidos com outras doenças mais comuns em gatos, o que pode ter levado a uma subvalorização dos valores desta doença (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Pereira da Fonseca *et al.*, 2013).



Figura 4 - A - Gato com leishmaniose felina. B – Nódulos cutâneos nos pavilhões auriculares, C – Lesões ulcerativas nos membros posteriores, D – Lesões ulcerativas no membro anterior direito (Original de Alexandra Basso37; Pereira da Fonseca *et al.*, 2013).

2.11 Alterações hematológicas e bioquímicas

Apesar de grande parte dos gatos com leishmaniose não apresentarem alterações hematológicas, quando as apresentam, as mais comuns são anemia, muitas vezes não regenerativa, anemia normocítica normocrômica, leucocitose com eosinofilia, neutrofilia, auto-aglutinação de eritrócitos, pancitopenia, trombocitopenia, linfocitose e monocitose ou leucopenia, caracterizada, sobretudo, por neutropenia e/ou linfopenia. Foram, também, descritas outras alterações bioquímicas, nomeadamente hiperglobulinémia, com elevação

das gama e beta-globulinas, hipoalbuminemia, fósforo e glicose elevados, assim como alterações nos parâmetros hepáticos (aumento dos níveis de fosfatase alcalina, alanina transferase e hipercolesterolemia) e renais (creatinina elevada, azotemia, aumento da ureia, hipermagnesemia, hiperproteinemia e proteinuria) os quais, em casos extremos, podem indicar uma insuficiência renal (Solano-Gallego *et al.*, 2013; Pinto, 2013).

2.12 Diagnóstico

O diagnóstico de leishmaniose é difícil. Os diagnósticos diferenciados considerados num quadro clínico de leishmaniose são diagnósticos dermatológicos, como dermatite atópica, infecção bacteriana, *Pemphigus foliaceus* e Pênfigo eritematoso, diagnósticos infecciosos como criptococose e esporotricose e diagnósticos neoplásicos como carcinomas, linfomas e mastocitomas (Rüfenacht *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2010).

Para diagnóstico desta parasitose, não existe nenhum teste de referência ou “gold standard”, pelo que a escolha do mesmo deve ser feita consoante o caso individual. Depois de um exame físico e anamnese detalhada, deverá começar-se por pedir um hemograma completo, bioquímicas, proteinograma e urianálise. Posteriormente, podem fazer-se várias abordagens diagnósticas, a seguir descritas (Rüfenacht *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2010).

2.12.1 Diagnóstico parasitológico

O exame direto é feito através da observação macroscópica de formas amastigotas a partir de aposições ou esfregaços de baço/fígado/gânglio/pele/medula. Para este tipo de análises, normalmente, as amostras são obtidas através de técnicas invasivas, o que geralmente não é praticável para a deteção do parasita em animais assintomáticos (Ramos, 2012).

Quando corado com Giemsa, os esfregaços parasitados mostram formas amastigotas livres ou intracelularmente em monócitos, macrófagos e neutrófilos (figura 5). O citoplasma apresenta uma coloração azul pálida com um núcleo relativamente grande basofílico e o cinetoplasto vermelho escuro ou violeta. O exame direto é considerado vantajoso, económico e a melhor forma de diagnóstico, pois é o único capaz de detetar diretamente o parasita (Ozon *et al.*, 1998; Ramos, 2012).

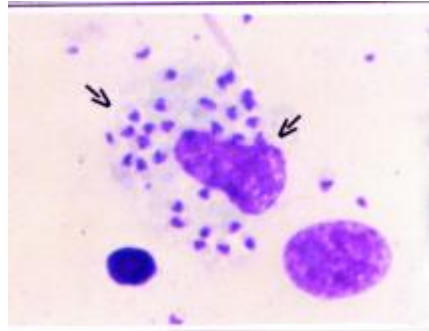


Figura 5 - Macrófago parasitado com amastigotas corado com Giemsa (1000x) (Adaptado de Gontijo & Carvalho, 2003).

Podem, também, observar-se amastigotas através de citologia e histologia das lesões cutâneas como úlceras, nódulos e vesículas hemorrágicas. Na análise histológica coram-se as amostras com hematoxilina e eosina. Porém, a detecção do parasita é difícil visto ser uma técnica que requer tempo e experiência. No exame histopatológico utilizam-se amostras de lesões oculares, cutâneas e lesões das junções mucocutâneas. Em casos positivos, observa-se uma inflamação granulomatosa difusa com amastigotas presentes em macrófagos, um número variável de linfócitos e células plasmáticas e, em menor extensão, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos. Em casos de carga parasitária baixa, como auxílio ao diagnóstico, pode fazer-se um exame imuno-histoquímico aos cortes histológicos (Ramos, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2013).

O exame cultural baseia-se na observação microscópica de culturas promastigotas de material biológico infetado. Estas observações ocorrem semanalmente e, apesar de apresentarem 100% de especificidade, esta técnica é, atualmente, pouco utilizada pois necessita de um longo período de incubação e é dependente da carga parasitária. Ainda assim, é utilizada para obter número suficiente de parasitas para identificação isoenzimática que é, em seguida, utilizada como antigénio para diagnósticos imunológicos, modelos de infeção experimental e para fazer avaliações *in vitro* de fármacos (Ramos, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2013).

2.12.2 Diagnóstico molecular

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “Polymerase Chain Reaction”) convencional como método de diagnóstico tem sido cada vez mais utilizada. É considerada rápida e fiável pois permite que sejam amplificadas quantidades mínimas do DNA do parasita. A técnica faz uma amplificação enzimática *in vitro* de um número de cópias de segmentos específicos de DNA do parasita. A detecção de DNA é possível em várias amostras de tecidos, como medula óssea, biopsias de pele, aspirados de linfonodos, sangue periférico, cortes histológicos de tecidos embebidos em parafina e no

próprio vetor. A técnica utiliza oligonucleótidos iniciadores (*primers*), que são desenhados para amplificar sequências alvo do parasita, proporcionando um diagnóstico específico quando se utiliza uma amostra do hospedeiro (Paltrinieri *et al.*, 2010). A eficácia da técnica depende dos *primers*, método de extração de DNA, material biológico utilizado e do tipo de PCR escolhido. A PCR é uma boa técnica para avaliar o papel dos gatos na transmissão da doença, devido à sua elevada especificidade (Braga *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2014b; Rennó *et al.*, 2014).

2.12.3 Diagnóstico serológico

O diagnóstico serológico pode fazer-se através de imunofluorescência indireta (IFI), contraímuno-electroforese (CIE), ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”), teste de aglutinação direta (DAT, do inglês “Direct Antiglobulin Test”), entre outros (Cardoso *et al.*, 2010).

Todos são métodos de elevada sensibilidade e especificidade, embora tenham algumas limitações, nomeadamente não permitem diagnosticar a infeção quando não há produção de anticorpos, durante o período de seroconversão e em alguns animais assintomáticos (Pereira da Fonseca *et al.*, 2013).

Um estudo recente indica que o pico de anticorpos nos gatos só se verifica 20 semanas após a infeção, quando as lesões cutâneas estão já em fase de resolução, verificando-se, assim, uma baixa relação entre o tamanho das lesões e os títulos de anticorpos. Deste modo, a ausência de anticorpos anti-*Leishmania* no soro dos gatos com lesões cutâneas pode levar a um diagnóstico clínico errado, uma vez que se pode tratar de uma fase inicial com baixa produção de anticorpos (Ramos, 2012).

Técnicas diagnósticas:

ELISA – Ensaio imunoenzimático – É um método simples e rápido que permite testar, simultaneamente, várias amostras e utilizar uma gama diversa de antígenos. Este método utiliza um complexo que contém um anticorpo, chamado conjugado, que é caracterizado por se encontrar ligado a uma enzima. A adição de um substrato específico da enzima origina uma reação cromogénica que permite identificar a presença do complexo enzima/anticorpo/antígeno (Nasereddin *et al.*, 2008; Ramos, 2012).

IFI – Teste de imunofluorescência indireta - Esta técnica é considerada o método de referência para o diagnóstico serológico, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade. A IFI faz pesquisa de anticorpos presentes no soro e utiliza todo o

corpo do parasita como antigénio. A deteção de anticorpos em gatos é mais difícil do que em cães pois, ao contrário destes, quando os gatos são infetados/expostos não sofrem imunossupressão com conseqüente sobre produção de anticorpos. A técnica tem desvantagens, como o facto de requerer equipamentos dispendiosos, ser trabalhosa devido à necessidade das diluições em série do soro, sendo pouco prática para o rastreio de um grande número de amostras. A técnica, quando aplicada a soros de gatos, apresenta títulos muito baixos não sendo suficientemente sensível para detetar a infeção. Desta forma os limiares de positividade ou “*cut-off*” assumidos para soros felinos têm sido mais baixos (entre 1:40 e 1:100), mas sem uniformidade entre laboratórios (Figueiredo *et al.*, 2009; Sarkari *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2010; Rennó *et al.*, 2014).

TAD – Teste de aglutinação direta – O DAT é pouco dispendioso e pode ser utilizado em grande escala apresentando resultados de fácil leitura e interpretação. Esta técnica utiliza reagentes estáveis e, como antigénios, faz uso de formas promastigotas integrais em suspensão ou numa forma liofilizada, permitindo a pesquisa de anticorpos em plasma e/ou soro. Uma variante deste teste é o teste de aglutinação rápida que utiliza uma concentração parasitária superior e um menor volume de reagentes. Pode ser realizado com apenas uma diluição e os resultados são lidos após três horas. Os resultados são quantitativos, pelo que o teste pode ser utilizado para triagem, especialmente em áreas endémicas (Ramos, 2012).

Para o diagnóstico de leishmaniose em gatos não existe uma só técnica que possa ser considerada ideal, pois nenhuma tem todas as características desejáveis como, execução fácil, custos acessíveis, rapidez e elevada sensibilidade e especificidade. Por isso, recomenda-se uma combinação de técnicas acompanhadas por avaliação dos sinais clínicos, características epidemiológicas da zona e exames laboratoriais (Rennó *et al.*, 2014)_

As falhas frequentes no diagnóstico de leishmaniose em gatos devem-se, não só à falta de conhecimento por parte dos profissionais, incluindo veterinários, mas também à falta de estudos sobre o tema e à existência de proprietários que não levam os gatos frequentemente ao veterinário, impedindo o diagnóstico, ou levando a um diagnóstico tardio (Rennó *et al.*, 2014).

2.13 Tratamento

Em cães, para o tratamento da leishmaniose utilizam-se como fármacos de primeira linha o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o alopurinol (Ziloric®). Os

fármacos considerados de segunda linha são a aminosidina (Gabrocol[®]), o levamisol (Ripercol[®]) e a miltefosina (Milteforan[®]). O esquema e dosagem dos diferentes fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose canina é muito variável. É muito importante avaliar, periodicamente, a função renal pois o alopurinol, os outros fármacos e o próprio parasita têm poder nefrotóxico, levando a casos de insuficiência renal (aguda e crônica). É, também, importante fazer regularmente ecografias abdominais para ver a bexiga, pois é comum a formação de urólitos de xantina, secundária à administração de alopurinol (Pinto, 2013).

A combinação de antimoniato de meglumina com alopurinol é considerada a forma terapêutica mais eficaz e o protocolo de primeira linha para a doença. Os cães tratados com esta combinação têm apresentado um período de remissão mais longo, comparado quando os tratados só com um fármaco (Olivia, *et al.*, 2010).

A miltefosina em combinação com o alopurinol tem sido sugerida como alternativa à combinação de antimoniato de meglumina com alopurinol (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Não existem vacinas para o controlo da leishmaniose humana e felina. A terapêutica é limitada, onerosa e com eventuais efeitos colaterais. A falta de eficácia dos fármacos e de ensaios de novos agentes terapêuticos está a levar ao aparecimento de resistências, o que cria um grave problema de saúde pública. Atualmente, não há registos que evidenciem o melhor tratamento para leishmaniose pelo que a eleição do fármaco deve basear-se na opção mais segura para cada caso individual (Solano-Gallego *et al.*, 2013).

No tratamento da leishmaniose em gatos o fármaco mais utilizado é o alopurinol. Este administra-se por via oral, sendo a posologia entre 10-15mg/kg e 20mg/kg SID. A apresentação comercial é composta por comprimidos de 100mg cada, pelo que a administração da dose adequada é difícil. Porém, tal como nos cães, quando se pára de administrar alopurinol é comum reaparecerem sinais clínicos. O alopurinol atua através da inibição da xantina oxidase, provocando a diminuição da produção de ácido úrico através do bloqueio na conversão de hipoxantina em xantina e xantina em ácido úrico. Regra geral, os animais toleram bem o alopurinol. Em alguns casos, pode-se observar um aumento das enzimas hepáticas ou um quadro de insuficiência renal aguda (Pinto, 2013).

O antimoniato de meglubima também é utilizado nos gatos em doses de 5mg/kg SID, em três períodos de quatro semanas combinado com cetaconazol e alopurinol. O antimoniato de meglumina, nos casos em que foi utilizado, produziu uma boa resposta clínica. Este fármaco interfere na glicólise dos parasitas e no mecanismo dos ácidos gordos, atuando ao nível da síntese de adenosina trifosfato (ATP). Administrado habitualmente por via subcutânea ou intramuscular é, depois, eliminado essencialmente através dos rins, não

tendo sido registados casos de danos renais induzidos pelo antimoniato. O tratamento com este fármaco induz diminuição da carga parasitária e restauração de resposta imune mediada por células, observa-se uma diminuição dos títulos de anticorpos específicos no soro. O efeito secundário mais comum é dor e inchaço na zona de injeção (Olivia *et al.*, 2010; Pinto, 2013).

Podem, também, administrar-se fármacos com atividade inibitória da doença, como anfotericina B (antifúngico), cetoconazol (antifúngico), metronidazol (antiprotozoário) e fluoroquinonas (antibiótico). A anfotericina B atua ao nível da parede do parasita formando poros que provocam desequilíbrio osmótico e, conseqüentemente, a lise do parasita. Porém, esta tem muitas desvantagens como a via de administração intravenosa (IV) e os seus efeitos nefrotóxicos (Solano-Gallego *et al.* 2009). Nos casos em que há lesões cutâneas nodulares, pode recorrer-se a excisão cirúrgica; porém, já foram descritos casos de recorrência após a excisão. Casos cutâneos de apresentação difusa devem ser tratados com antifúngicos e antibióticos tópicos e parenterais (Solano-Gallego *et al.*, 2013; Pennisi *et al.*, 2013; Manolis *et al.*, 2014).

2.14 Prognóstico

O correto diagnóstico e escolha do tratamento são fundamentais para um prognóstico favorável. O prognóstico depende da carga parasitária, estado imunitário, tipo de lesões, cronicidade da infeção e nível de dedicação do proprietário do animal parasitado. É fundamental que o dono seja bem informado sobre as possíveis complicações e o melhor tratamento a ser aplicado para cada caso individual. É, também, importante transmitir a mensagem de que não existe nenhum tratamento ideal nem cura e que as recidivas são muito comuns (Solano-Gallego *et al.*, 2013).

2.15 Profilaxia

Há vários aspetos a ter em conta quando é necessário decidir sobre o melhor método profilático a utilizar. Assim, por exemplo, um dono que pretenda viajar com o seu cão para uma zona endémica deverá, antes de mais, ter a noção que a ativação do produto que pretende utilizar (pipeta, coleira etc...) pode demorar vários dias, pelo que se deverá planear com a devida antecedência a proteção a utilizar para o seu animal (Pinto, 2013).

Animais que já tenham sido anteriormente infetados necessitam, também, de continuar a fazer profilaxia para que não haja lugar à reinfeção. Esta não só piora o quadro clínico do animal, pois aumenta a carga parasitária, como permite a infeção dos vetores e a transmissão do parasita a outros animais e/ou ao homem (Pinto, 2013).

Os métodos profiláticos mais utilizados são:

- Vacinação – só disponível para a espécie canina. O sucesso da mesma ainda não está completamente determinado (Solano-Gallego *et al.* 2009).
- Piretroides sintéticos - apresentam uma baixa toxicidade para cães bem como uma eficácia elevada sendo, por isso, um dos repelentes de insetos mais usado.
- Coleiras – o seu inseticida (deltametrin) é libertado de forma lenta mas eficaz com uma proteção de cerca de seis meses, a funcionar em pleno uma semana após a colocação no animal. Se o animal se encontrar numa zona ou região não endémica ou fora do principal período de atividade dos insetos a duração da proteção poderá ir até 12 meses (Pinto, 2013).
- Pipetas - de libertação lenta, abrangem um período de proteção menor do que as coleiras. No caso das pipetas de permetrina combinada com imidacloprid, a duração da proteção é de, apenas, 21 dias. Devido à curta duração da atividade ectoparasiticida, as pipetas e aerossóis exigem um maior acompanhamento por parte dos donos, já que a sua aplicação deverá ter lugar frequentemente. É, ainda, importante que seja feita uma aplicação correta do produto (Pinto, 2013).

Para controlo ambiental é possível a utilização de inseticidas, quer pela pulverização do ambiente, quer pela impregnação de redes mosquiteiras. As substâncias que são utilizadas nestes métodos são iguais ou semelhantes às utilizadas nas formulações a aplicar aos animais. É preciso ressaltar que, apesar de existirem vários inseticidas/repelentes no mercado, todos eles são tóxicos para os gatos, pois estes são sensíveis às moléculas dos piretroides (Pinto, 2013).

Não existe informação disponível sobre a prevenção da leishmaniose em gatos. Algumas medidas que podem ser implementadas são a diminuição ou impedimento do acesso ao exterior por estes animais nas horas de maior atividade do vetor e realizar um controlo do ambiente com inseticidas, eletrocutores, aparelhos de ultrassom repelentes de insetos e redes mosquiteiras (Pereira da Fonseca *et al.*, 2013; Pinto, 2013).

É, também, importante tomar medidas de redução dos microhabitats favoráveis aos flebotomos na periferia da casa onde o animal e o seu dono habitam. É, portanto, fundamental a consciencialização das populações para os cuidados higieno-sanitários básicos, nomeadamente para o correto acondicionamento do lixo, como forma de redução das áreas de multiplicação dos hospedeiros errantes (Pereira da Fonseca *et al.*, 2013).

O lançamento recente de uma coleira que contém flumeterina, um químico da classe dos piretroides, que é bem tolerado pelos gatos, pode representar uma boa medida profilática para redução do risco de infeção em gatos residentes de zonas endémicas

(Pennisi *et al.*, 2015)

2.16 Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a presença de infeção por *Leishmania infantum* numa colónia de gatos errantes, que habitam na Ilha de Faro, através das técnicas de imunofluorescência indireta e PCR. Com esta investigação pretendeu-se, também, contribuir para melhorar a compreensão actual do papel do gato no ciclo de vida do parasita naquela região.

3. Material e Métodos

3.1 População em estudo

A presente investigação surgiu na sequência de um projeto de colaboração entre a “Change for animal Foundation” e a FMV-ULHT, que teve como objetivo esterilizar, desparasitar e vacinar uma colónia de gatos errantes residentes na Ilha de Faro. A ilha tem aproximadamente 230 gatos errantes. Desses 230 gatos foi recolhido sangue e posterior análise laboratorial de 123 gatos (Agência Lusa, 2014).

A Ilha de Faro, também conhecida por Praia de Faro, é uma Península, chamada Península de Ancão, que separa o mar da Ria Formosa e está ligada à terra firme do lado leste. No inverno, os gatos passam alguma fome. No verão, têm excesso de comida, porque são alimentados pelos pescadores e pelos turistas. Secundariamente, nesta época, a reprodução aumenta provocando, assim, um maior número de reservatórios para *Leishmania* spp. (Agência Lusa, 2014).

Todos os animais envolvidos no projeto foram identificados numa folha de registo com um número individual, tipo de acondicionamento do sangue periférico (sangue em EDTA, sangue em tubo seco), faixa etária, espécie, género, presença de pulgas e/ou carraças e sinais clínicos (lesões dérmicas, linfadenopatia, lesões oculares, atrofia muscular, epistaxis, palidez das mucosas, diarreia, entre outros).

3.2 Recolha de amostras

Previamente à colheita de sangue efetuou-se a assepsia da zona de venopunção

com álcool a 70°. A zona de colheita foram as veias jugulares. Esta foi realizada com seringas B.Braun de 5 ml. As agulhas foram B.Braun de 21 e 22G com comprimento de 21X1 e 22X1, respetivamente.

Após a colheita de sangue total, este foi colocado num tubo que continha como anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid”) e num tubo seco. O sangue no tubo de EDTA foi homogeneizado suavemente, de forma a não danificar o material biológico. No sangue colhido para tubo seco, após retração do coágulo, foi efetuada uma centrifugação a 3500 rpm, por 10 minutos, para separação do soro. Este foi, de seguida, separado para um microtubo devidamente identificado e conservado a -20°C. Todos os tubos foram identificados com o número da ficha correspondente ao animal.

3.3 Detecção laboratorial de anticorpos anti-*Leishmania infantum* por IFI

A IFI foi a técnica laboratorial utilizada para a deteção de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum*, tendo sido utilizado o kit comercial “MegaScreen®FLUOLEISH” (Megacor Diagnostik).

O soro do gato foi diluído em tampão fosfato salino (PBS, do inglês “Phosphate Buffered Saline”) e incubado em poços individuais de uma lâmina que contém o antigénio. Após incubação e lavagem com PBS, para remoção dos produtos que não tenham ficado ligados ao antigénio, o conjugado anti-IgG, específico de gato, é adicionado indo ligar-se aos anticorpos da amostra. A observação do resultado foi efetuada, num microscópio OLYMPOUS BX51, por visualização da fluorescência emitida.

Execução do teste

1. Retirar para a temperatura ambiente o kit do teste MegaScreen®FLUOLEISH que se encontra refrigerado a uma temperatura entre os 2 e os 8°C.
2. Preparar, para cada soro a testar, uma diluição de 1:10, pipetando 3µl de soro e 27µl de PBS para um microtubo e homogeneizar. O *cut-off* utilizado foi 1:10. (Maia, C., 2015, comunicação pessoal)
3. Em cada lâmina identificar os poços com as amostras e os controlos positivo e negativo. Os controlos são referentes à espécie canina, pois a técnica está otimizada para a mesma. De forma a facilitar a leitura, o controlo positivo colocou-se sempre no poço 1 (canto superior esquerdo) e o poço negativo no poço 10 (canto inferior esquerdo).

4. Aplicar 20µl (uma gota) de cada controlo, nos respetivos poços.
5. Aplicar 20µl do soro diluído nos restantes poços.
6. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar a 37°C, durante 30 minutos.
7. Após retirar da incubadora, lavar a lâmina duas vezes com PBS em esguicho. O esguicho não deve ser apontado diretamente para os poços.
8. Adicionar em cada poço com as amostras e no controlo negativo uma gota de conjugado isotiocinato de fluoresceína (FITC, do inglês “Fluorescein Isothiocyanate”) anti-IgG específico para gato (Megacor Diagnostik GmbH, Austria). No controlo positivo foi utilizado um conjugato anti-IgG específico de cão (providenciado com o kit.) Colocar, novamente, em câmara húmida e incubar a 37°C, durante 30 minutos.
9. Após incubação lavar com PBS em esguicho.
10. Adicionar o meio de montagem na lâmina, e colocar uma lamela por cima, cuidadosamente, para não criar bolhas de ar.
11. Observar ao microscópio de fluorescência com um filtro para isotiocinato de fluoresceína. A observação foi efetuada com uma objetiva de 40x e uma ocular de 10x, pelo que a observação foi feita a uma ampliação de 400x.

Interpretação dos resultados

O resultado é considerado positivo, quando a observação microscópica da amostra se apresenta com fluorescência igual à do controlo positivo. O controlo positivo apresenta uma fluorescência nítida e brilhante onde se podem observar as formas promastigotas de *Leishmania infantum*. O resultado negativo é apresentado por fluorescência fraca ou inexistente e promastigotas escurecidos e/ou avermelhados (figura 6).

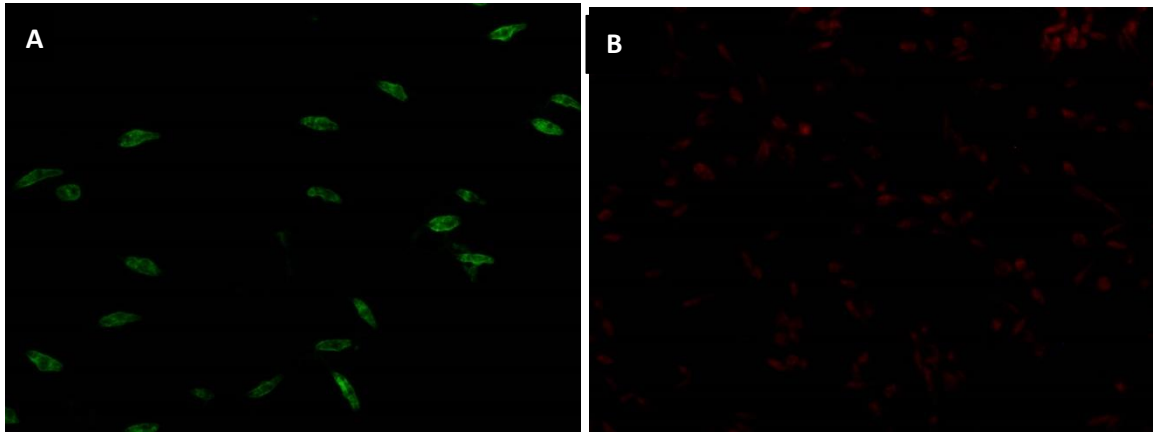


Figura 6 - Fotografia de um resultado de IFI para detecção de IgG anti-*Leishmania infantum*. A- Resultado positivo, B – resultado negativo (original do autor).

3.4 Extração de DNA genômico a partir de sangue total

O DNA foi extraído a partir de sangue total, usando o “ISOLATE Genomic DNA Mini Kit” (Bioline[®]).

A extração liberta o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês “desoxirribonucleic acid) das células. Para que este possa ser libertado, tem de ocorrer a lise da parede celular e das membranas celular e nuclear. O tampão de lise permite a lise celular e participa na desnaturação das proteínas. A proteinase K hidrolisa as proteínas celulares e participa na inativação das DNases. Esta hidrólise deixa o DNA menos compacto, o que facilita a sua posterior amplificação. Seguidamente, isola-se o DNA, separando-o de outros componentes em suspensão. A separação ocorre devido à adsorção do DNA à membrana de sílica ativada, presente no interior da “Spin Column D”. O “Binding Buffer” proporciona as condições de salinidade e pH necessárias para a adsorção ocorrer.

Posteriormente são realizadas lavagens consecutivas com o “Wash Buffer D”, sendo a eluição do DNA feita em água desionizada estéril. As lavagens permitem remover impurezas, detritos celulares e/ou contaminantes que tenham ficado adsorvidos à membrana de sílica (Rapley, 2000).

Execução experimental

1. Num microtubo de 1,5 ml, adicionar 400 µl de Lysis Buffer AL, 25µl de Proteinase K e 100 µl de sangue total.
2. Agitar no vortex e incubar a 50°C, em banho-maria (Precistern, P-selecta[®]), durante 10 minutos.

3. Agitar no vortex e adicionar 200 µl de Binding Buffer.
4. Agitar no vortex, durante 15 segundos, e fazer um *short spin* numa centrífuga (Galaxy, 14D, VWR®).
5. Transferir a amostra para a Spin Column D que se encontra num tubo coletor novo.
6. Centrifugar a 10,000 x g, durante 2 minutos.
7. Descartar o tubo coletor e colocar a Spin Column D num novo tubo coletor.
8. Adicionar 700 µl de Wash Buffer D.
9. Centrifugar a 10,000 x g, durante 1 minuto.
10. Descartar o filtrado e reutilizar o tubo coletor.
11. Repetir os passos 8 e 9.
12. Centrifugar a 13,000 x g, durante 2 minutos. Descartar o tubo coletor.
13. Colocar a Spin Column D num microtubo de 1,5 ml.
14. Identificar os tubos e adicionar 100 µl de água desionizada diretamente na membrana da Spin Column.
15. Incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto.
16. Centrifugar a 6000 x g, durante 1 minuto
17. Descartar a Spin Column D e guardar o tubo com DNA eluído a -20°C.

3.5 Avaliação da integridade física do DNA extraído

A avaliação da integridade física do DNA extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose. A migração ocorreu numa tina Enduro™ Horizontal Gel Box – Electrophoresis (Labnet®). O gel de agarose foi preparado a uma concentração de 0,8% (m/v).

Execução experimental

1. Pesar 1,6 g de agarose (SeaKem® LE Agarose, Lonza®), num erlenmeyer.
2. Adicionar 200 ml de tampão Tris-Borato (90mM) –EDTA (2mM), pH 8,3, (TBE 1x).
3. Aquecer no micro-ondas até fusão completa da agarose. O gel deverá apresentar-se translúcido.
4. Arrefecer o gel, passando o exterior do erlenmeyer por água corrente e agitar.
5. Colocar no suporte de eletroforese os pentes para formar os poços do gel.
6. Adicionar ao gel 0,56 µl de GelRed Nucleic Acid Stain® (Biotium®).

7. Colocar o gel no suporte de eletroforese e deixar solidificar.
8. Colocar o gel solidificado na tina de eletroforese e adicionar tampão TBE 1x até que este cubra todo o gel.
9. Em cada poço de uma placa de 96 poços, adicionar 2 µl de *Loading Buffer* [glicerol 30% (m/v), azul de bromofenol 0,25% (m/v)] e 8µl de DNA extraído de cada amostra.
10. Homogeneizar a mistura de cada poço com vários movimentos de *up and down* efetuados com a micropipeta.
11. Aplicar as amostras nos poços do gel.
12. Efetuar a eletroforese a uma voltagem de 100 volts (V), durante, aproximadamente, 60 minutos.
13. A visualização do resultado é feita num transiluminador Alfa Gene[®], por emissão da fluorescência do GelRed.

3.6 Amplificação, por PCR, de um fragmento do gene beta-glucuronidase felina

A amplificação de um fragmento do gene beta-glucuronidase felino (*fGUSB*, do inglês “feline Beta-glucuronidase” foi feita em todas as amostras para avaliar a integridade do DNA extraído das mesmas e a ausência de inibidores da DNA polimerase.

A enzima beta-glucuronidase felina está localizada nos lisossomas, estruturas contidas nas células, que digerem e reciclam diferentes tipos de moléculas. A beta-glucuronidase está envolvida na divisão de grandes moléculas chamadas glicosaminoglicanos (GAGs). Os GAGs são compostos por moléculas de açúcar que estão ligadas entre si formando uma longa cadeia. Para quebrar estas grandes moléculas, são removidos açúcares individuais de uma ponta da molécula, um de cada vez. A beta-glucuronidase remove um açúcar chamado ácido glucorónico, quando está no fim da cadeia de GAG.

Todo o material utilizado (pontas, micropipetas, suportes e microtubos) foi previamente exposto a luz UV, durante 20 minutos, numa câmara de fluxo laminar Bio48M (Faster[®]). Toda a área de trabalho foi, ainda, limpa com cloreto de sódio a 10%. Para a amplificação de um fragmento do gene *fGUSB*, foi efetuada uma reação de PCR convencional com 25 µl de mistura reacional. Esta continha 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline[®]), 1 U de MyTaq[™]DNA Polymerase (Bioline[®]), 10 pmol de cada *primer*, 100 ng de DNA genómico e água destilada estéril até perfazer o volume final. O MyTaq Reaction Buffer é uma solução tampão que contém 1mM da mistura de dNTP`s (desoxirribonucleósidos trifosfato) e 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂).

O fragmento amplificado tinha a dimensão de 177 pares de bases (pb). A sequência de *primers* foi a apresentada a seguir (tabela 8).

Tabela 2 - Sequência de *primers* utilizados na amplificação do gene *fGUSB*

Primers	Sequência (5' → 3')
<i>fGUSB</i> Fw	GCGTTCCTTTTGCGAGAGAG
<i>fGUSB</i> Rev	GCTGTGGAAGTTGCCCTTA

A reação de amplificação ocorreu num termociclador Rotor Gene-Q (QIAGEN®), de acordo com as condições da tabela 9.

Em todas as reações de PCR realizadas foram incluídos um controlo positivo e um controlo negativo.

Tabela 3 - Condições da reação de PCR na amplificação de *fGUSB*

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
95°C	1 min	--
95°C	20 seg	30
55°C	20 seg	
72°C	20 seg	
72°C	5 min	--

3.7.1 Visualização dos produtos amplificados por PCR

As amostras foram sujeitas a electroforese em gel de agarose a 1,5%(m/v), de acordo com o seguir descrito.

Execução experimental

1. Pesar 3 g de agarose (SeaKem® LE Agarose, Lonza®), num *erlenmeyer*.
2. Adicionar 200 ml de tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1x.
3. Aquecer no micro-ondas até fusão completa da agarose. O gel deverá apresentar-se translúcido.

4. Arrefecer o gel, passando o exterior do *erlenmeyer* por água corrente e agitando.
5. Colocar no suporte de eletroforese os pentes para formar os vários poços.
6. Adicionar ao gel 0,86 µl de GelRed Nucleic Acid Stain® (Biotium®).
7. Colocar o gel no suporte de eletroforese e deixar solidificar.
8. Colocar o gel solidificado na tina de eletroforese e adicionar tampão TBE 1x até que este cubra todo o gel.
9. Adicionar 1,5 µl de *Loading Buffer* [glicerol 30% (m/v), azul de bromofenol 0,25% (m/v)] a 8 µl de cada produto de PCR, incluindo os controlos positivo e negativo, e homogeneizar a mistura com vários movimentos de *up and down*, efetuados com a micropipeta.
10. No primeiro poço do gel, colocar 6 µl de Hyperladder 100 bp (Bioline®).
11. Aplicar os produtos de PCR e os controlos nos poços seguintes.
12. Efetuar a eletroforese a uma voltagem de 100 volts (V), durante, aproximadamente, 60 minutos.
13. A visualização do resultado ocorre num transiluminador Alfa Gene® por emissão da fluorescência do GelRed Nucleic Acid Stain® (Biotium®).

3.8 Deteção de DNA de *Leishmania donovani* s.l. através da técnica de PCR

Nos organismos do género *Leishmania*, junto à base do flagelo, a mitocôndria diferencia-se numa estrutura denominada cinetoplasto.

O cinetoplasto é uma estrutura muito rica em DNA, que se encontra sob a forma de minicírculos e maxicírculos (figura 7).

Os minicírculos são pequenas moléculas de DNA circular de 800 pb e constituem um alvo molecular ideal para a deteção de *Leishmania* spp. porque se encontram presentes em milhares de cópias (10.000/parasita). Os *primers* utilizados no presente protocolo de PCR amplificam uma região de 447 pb do DNA dos minicírculos do cinetoplasto específica de *Leishmania donovani* s.l. (Cortes *et al.*, 2004).

cinetoplasto





Figura 7 - Identificação do cinetoplasto num organismo do género *Leishmania* (<http://www.leishrisk.net/leishrisk/Default.aspx?Menu=MenuMain&MIID=34&WPID=40&L=E>)

Todo o material utilizado (pontas, micropipetas, suportes e microtubos) foi, previamente, exposto a luz UV, durante 20 minutos, numa câmara de fluxo laminar Bio48M (Faster®). Toda a área de trabalho foi, também, limpa com cloreto de sódio a 10%. A amplificação foi efetuada por PCR convencional com 25 µl de mistura reacional. Esta continha 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 1 U MyTaq™DNA Polymerase (Bioline®), 10 µmol de cada primer (MC1 e MC2, tabela 10) e 10 µl de DNA de cada amostra. O MyTaq Reaction Buffer é a solução tampão que contém 1mM de mistura de dNTP`s e 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂).

Tabela 4 - Sequência dos *primers* MC1 e MC2.

Primers	Sequência (5' → 3')
MC1 (Fw)	GTTAGCCGATGGTGGTCTTG
MC2 (Rev)	CACCCATTTTTCCGATTTTG

A reação de amplificação ocorreu num termociclador Rotor Gene-Q series (QIAGEN®), de acordo com as condições da tabela 11.

Em todas as reações de PCR realizadas, foram incluídos um positivo e um controlo negativo.

Tabela 5 - Condições da reação de amplificação de *Leishmania donovani s.l.*

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
95°C	7 min	--
95°C	30 seg	30
60°C	30 seg	
72°C	30 seg	
72°C	7 min	--

3.8.1 Visualização dos produtos amplificados por PCR

As amostras foram sujeitas a electroforese em gel de agarose a 1,5%(m/v), conforme anteriormente descrito em 3.7.1.

3.9 Análise estatística

O programa utilizado para a análise estatística deste trabalho foi o Microsoft Excel 2013.

De forma a facilitar a interpretação dos dados recolhidos, foram definidos dois grupos etários distintos: i) o grupo jovem, que correspondia a gatos com idade inferior a um ano ii) o grupo adulto, que correspondia a gatos com idades compreendidas entre um e dez anos.

4. Resultados

4.1 Estatística descritiva

A amostra populacional foi constituída por 136 animais. Destes, dez eram cães e três não tinham espécie identificada, pelo que foram excluídos do estudo.

Relativamente ao género dos gatos envolvidos no estudo, 46,3% (57/123) eram fêmeas, 50,4% (62/123) eram machos e 3,3% (4/123) não apresentavam informação no registo (figura 8).

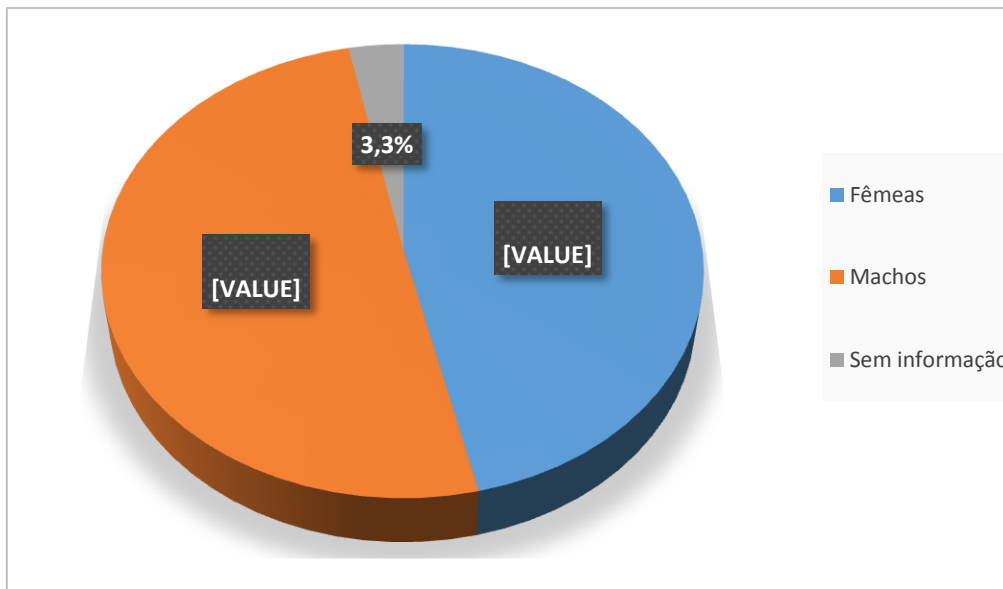


Figura 8 - Distribuição da amostra populacional por género

Relativamente à idade, 22,8% (28/123) dos gatos eram jovens (idade inferior a 1 ano), 72,4% (89/123) eram adultos (idade compreendida entre 1 e 10 anos) e 4,8% (6/123) não apresentavam informação no registo (figura 9).

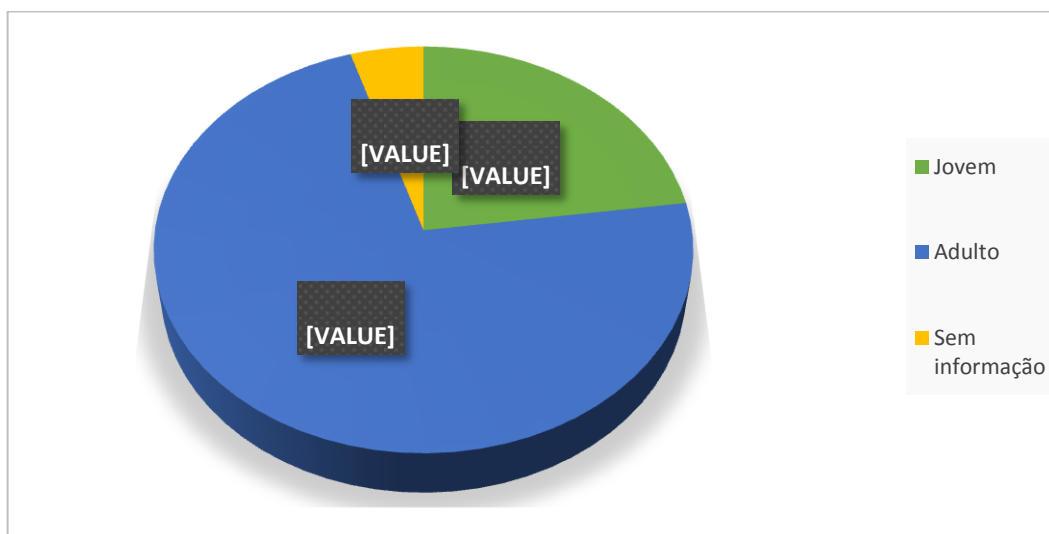


Figura 9 - Distribuição da amostra populacional por faixa etária.

Relativamente à presença de ectoparasitas, 30,9% (38/123) dos gatos participantes do estudo tinham pulgas, 61,8% (76/123) não tinham e 7,3% (9/123) não apresentavam informação no registo (figura 10). Nenhum gato apresentava carraças e quatro não apresentavam informação no registo.

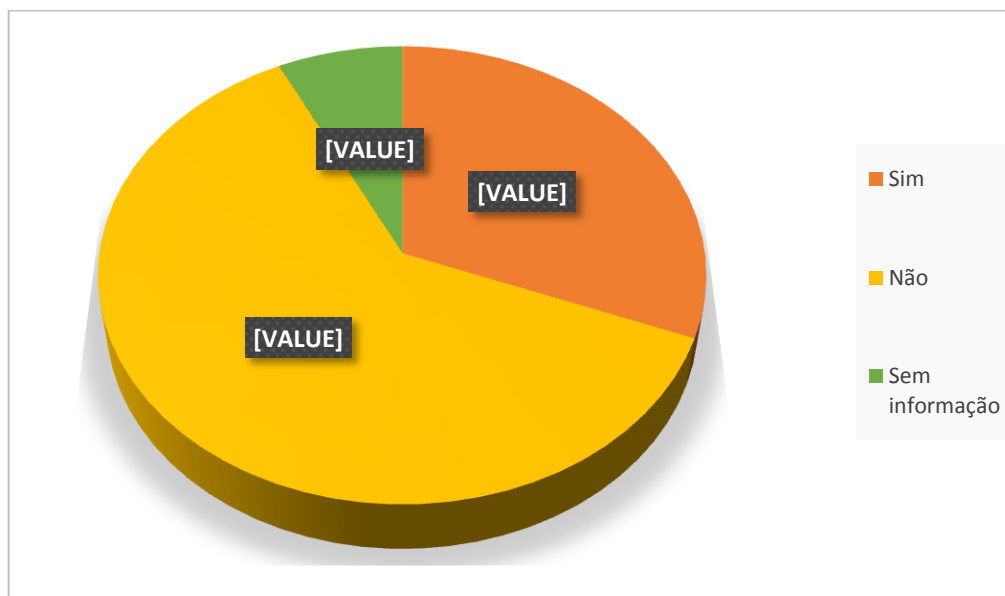


Figura 10 - Presença de pulgas na amostra populacional.

Relativamente à presença de sinais clínicos, 69,9% dos gatos apresentavam, pelo menos um, e 30,1% não apresentavam qualquer sinal clínico (figura 11). Dois gatos apresentavam lesões dérmicas, um linfadenopatia, um lesões oculares, nove diarreia e 30 palidez das mucosas.

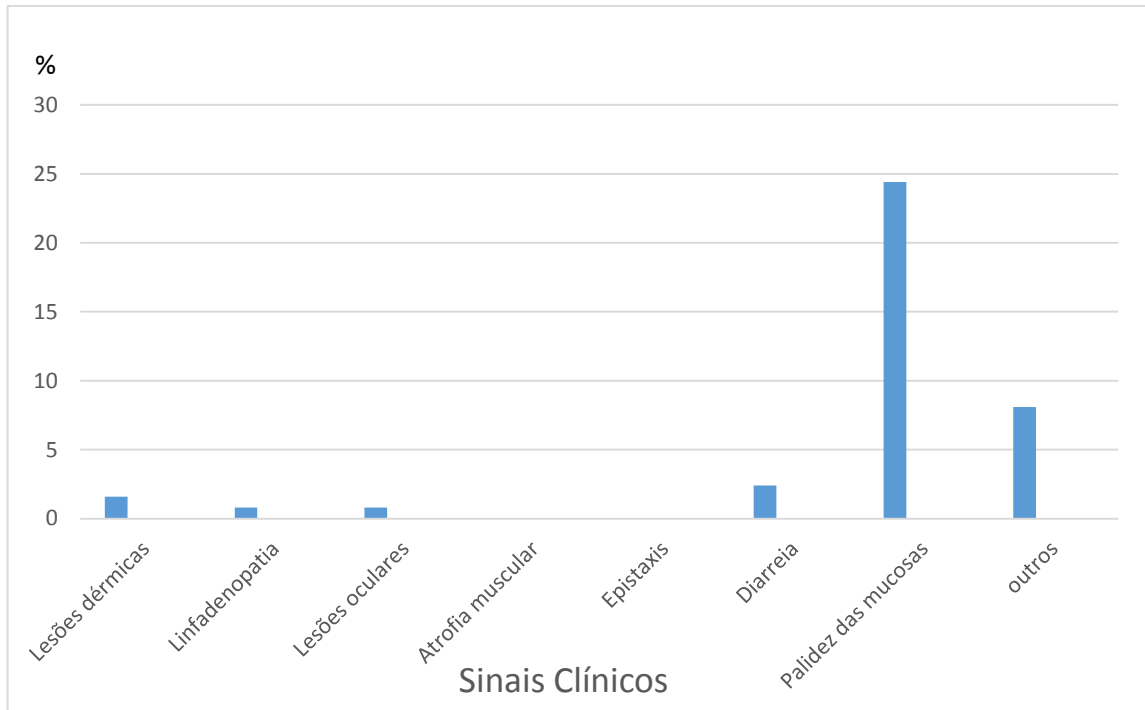


Figura 11 - Presença de diferentes sinais clínicos na amostra populacional.

4.2 Resultados laboratoriais

4.2.1 Pesquisa de anticorpos por IFI

Na técnica de imunofluorescência indireta todas as amostras foram negativas para a presença de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum*.

4.2.2 Avaliação da integridade física do DNA genômico

O DNA extraído foi considerado com boa integridade física quando, após eletroforese em gel de agarose, se observou uma banda de elevado peso molecular e sem arrastamento (figura 12).

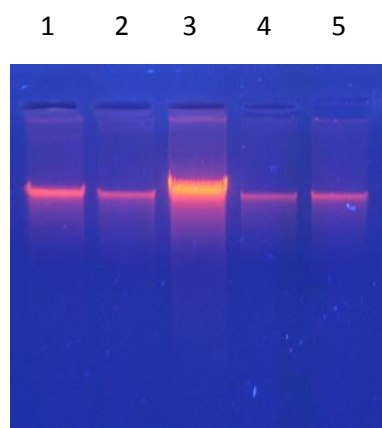


Figura 12 - Migração eletroforética em gel de agarose a 0,8%, do DNA extraído. 1-5: DNA genômico de cinco dos gatos em estudo.

Após estes resultados, podemos afirmar que a integridade física do DNA não se encontrava comprometida e, assim, foi possível prosseguir para a reação de PCR.

4.2.3 Amplificação, por PCR, de um fragmento do gene *fGUSB*

A amplificação de um fragmento de gene *fGUSB* (figura 13) foi bem sucedida em todas as amostras em estudo, evidenciando a ausência de inibidores da DNA polimerase que pudessem comprometer o sucesso da amplificação. A boa integridade física dos DNA's isolados, bem como a ausência de inibidores minimizam a probabilidade de ocorrência de resultados falso negativos na amplificação do DNA de *Leishmania donovani s.l.*

M 1 2 3 4 C+ C-

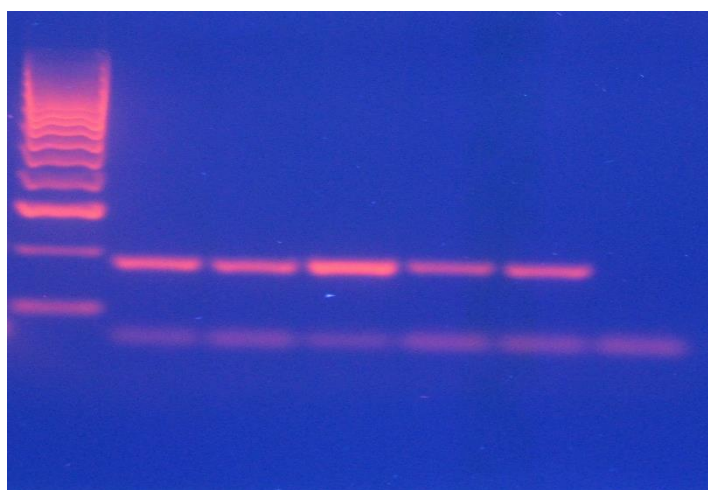


Figura 13 - Resultado de amplificação, por PCR, do gene *fgUSB*. M – Marcador de pesos moleculares (Hyperladder IV, Bioline). 1-4: Produto de PCR de quatro das amostras em estudo. C+ : controlo positivo. C- : controlo negativo.

4.2.4 Amplificação, por PCR, de DNA de *Leishmania donovani s.l.*

A amplificação, por PCR, do DNA de *Leishmania donovani s.l.* foi negativo para todos os gatos em estudo (figura 14). O controlo negativo nunca foi amplificado o que nos permite afirmar que não houve contaminação com DNA exógeno. O controlo positivo apresentou sempre amplificação.

M 46 47 48 81 82 83 84 85 C+ C+ C-

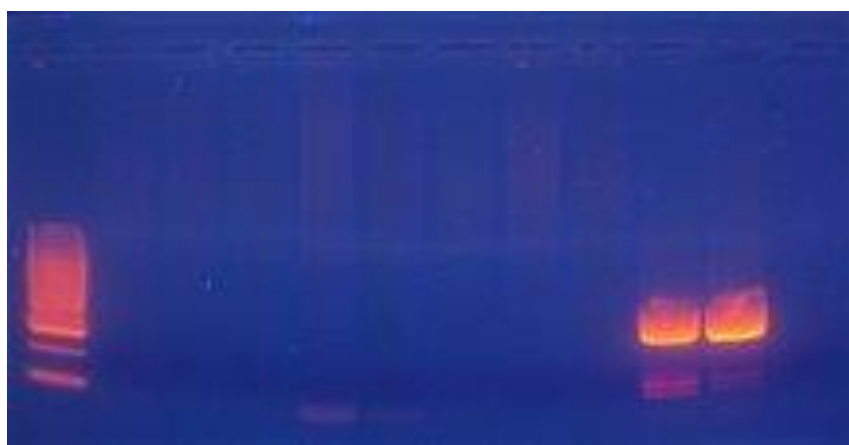


Figura 14 - Visualização de produtos de PCR para *Leishmania donovani s.l.*, de algumas amostras. M: marcador de pesos moleculares (Hyperladder IV Bioline), 46, 47, 48, 81, 82, 83, 84 e 85: oito das amostras em estudo. C+: controlo positivo, C- : controlo negativo.

5. Discussão de resultados

Portugal é um País endêmico para a leishmaniose, encontrando-se as regiões de Lisboa, Vale do Tejo e Algarve entre as mais afetadas (Maia *et al.*, 2010). Apesar de os cães serem considerados o principal reservatório de *Leishmania* spp., o verdadeiro papel dos gatos como reservatório e a sua importância no ciclo de vida do parasita não se encontra, ainda, bem definido (Maia & Campino, 2008).

No Algarve, a seroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em cães varia de 3,8%, em animais aparentemente saudáveis e aleatoriamente selecionados, a 40,6% em cães clinicamente suspeitos de terem leishmaniose. Em gatos, a seroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania infantum* varia de 1,3% na zona centro (Lisboa, Setúbal, Sintra e Loures), 2,8% no Norte (Trás-os-Montes e Alto Douro), a 3,7% no Algarve (Maia *et al.*, 2014b). Em gatos, estudos em que foi feita a deteção de DNA do parasita por PCR, descreveram taxas de infeção entre 0,3% em Trás-os-Montes e Alto Douro e 12,5% no distrito de Faro (Maia *et al.*, 2014b). Independentemente do método de diagnóstico utilizado, os resultados mais elevados foram sempre encontrados no Algarve. Isto pode ser justificado por fatores, como a existência de maior número de animais de rua ou com acesso permanente ao exterior, ou ao facto da região apresentar características climáticas mais favoráveis à proliferação e abundância do vetor (Maia *et al.*, 2014a). No presente trabalho, tanto a percentagem de seroprevalência como de deteção de DNA do parasita foram nulas. Estes resultados não são, contudo, comparáveis com os anteriormente publicados, uma vez que nunca um trabalho desta natureza havia, anteriormente, sido realizado na Ilha de Faro. Acresce, ainda, a particularidade deste local se encontrar geograficamente isolado e possuir algumas características que proporcionam um ambiente desfavorável ao desenvolvimento do flebótomo. Este vetor apresenta uma má capacidade de voo; o facto da Ilha de Faro ser uma zona isolada, para onde ele teria de voar durante uma distância significativa, pode dificultar o seu acesso ao local. Porém atualmente atualmente é possível os vetores serem transportados através de correntes eólicas. As características ventosas da Ilha provocam um efeito direto no vetor, não lhe proporcionando muita proteção. A restrição de alimentos também não parece ser um ponto favorável às necessidades do flebótomo pois, para além da fêmea se alimentar de sangue, tanto fêmeas como machos se alimentam de fontes naturais de açúcar, que são escassos. Por fim, a Ilha, também pelas suas características, não apresenta muitas zonas de águas estagnadas.

Atualmente, as organizações de saúde pública recomendam a realização de, pelo menos, dois testes diagnósticos, com base em metodologias diferentes, para a deteção e confirmação de infeção por *Leishmania* spp., uma vez que não existe um teste totalmente sensível e específico (OMS, 2010). No presente trabalho, foi feita, na população em estudo, a pesquisa por PCR, de DNA de *Leishmania donovani* s.l. e, por imunofluorescência

indireta, a pesquisa de IgG anti-*Leishmania infantum*. A utilização da técnica de PCR para diagnóstico é fiável, relativamente rápida, reproduzível e muito mais sensível do que os métodos parasitológicos convencionais e serológicos (Paltrinieri *et al.*, 2010). Em cães, a deteção do parasita através desta técnica é mais sensível a partir de amostras de medula óssea e de linfonodo, do que a partir de sangue periférico (Maia & Campino, 2008). Nesta espécie, utilizam-se amostras de colheita mais invasivas porque, regra geral, é necessário fazer o diagnóstico em caso de suspeita de leishmaniose. Relativamente aos gatos, a maior parte dos estudos utiliza como amostra o sangue periférico por ser menos invasivo e apresentar maior facilidade de obtenção (Maia 2016, comunicação pessoal). A análise de amostras biológicas como aspirados de linfonodos ou medula poderia ter aumentado a sensibilidade dos resultados obtidos. No entanto, dada a natureza e delineamento do presente trabalho, tal não foi nem seria exequível. A realização de um PCR *nested* para deteção do DNA do parasita, poderia, ter permitido aumentar a sensibilidade dos resultados. Relativamente à serologia, o alcance dos resultados obtidos poderá ser limitado devido ao facto da técnica avaliar a resposta imunitária humoral do hospedeiro à infeção por *L. infantum*, e os gatos, ao contrário dos cães, apresentarem um título de anticorpos muito reduzido, o que pode ser explicado por uma resposta celular mais competente.

O estudo realizado utilizou uma amostra populacional elevada, tendo sido estudada mais de 50% da população de gatos residentes naquela zona geográfica. A colheita de sangue ocorreu no mês de Outubro, mês com elevada época de atividade do vetor, excluindo, assim, a hipótese de um resultado negativo de natureza sazonal. A repetição da colheita de sangue cerca de 20 semanas depois, poderia ter eliminado a hipótese de alguns gatos estarem num período de seroconversão. Contudo, dada a natureza do projeto e a particularidade de ser uma colónia de animais errantes, tal não foi possível.

Maia e colaboradores (2014a), realizaram um estudo, para detetar agentes bacterianos e protozoários de doenças transmitidas por vetores em gatos domésticos e errantes do Sul de Portugal. Os gatos testados em centros veterinários e gatis provinham dos Distritos de Lisboa, Setúbal e Faro. Os gatos que provinham da zona de Lisboa viviam, maioritariamente, em apartamentos e os do distrito de Faro passavam a maior parte do tempo no exterior. Nestes últimos, através da técnica de PCR, em amostras de sangue periférico, os autores encontraram 12,5% de gatos positivos para *Leishmania infantum*. Apesar de terem estudado diferentes variáveis, os autores só identificaram três estatisticamente significativas. A percentagem de leishmaniose foi superior em gatos com mais de 12 meses de idade, em gatos que viviam em zonas rurais e em gatos protegidos contra ectoparasitas. Em relação à variável da idade, esta pode, provavelmente, ser explicada por uma exposição cumulativa dos gatos mais velhos ao parasita. Gatos que

vivem em zonas rurais têm mais exposição ao vetor, aumentando a probabilidade de infecção. Em relação aos acaricidas/inseticidas, uma vez que os piretroides são os únicos repelentes eficazes para o flebótomo e esta substância é tóxica para o gato, este resultado não parece ser surpreendente. Os animais do presente estudo apresentavam características semelhantes aos de Maia e colaboradores (2014a), nomeadamente, a maioria ter idade superior a um ano e viverem em ambiente rural. Posto isto, parece improvável que, na presença do parasita, nenhum gato fosse exposto/infetado.

Quase 70% dos gatos estudados apresentava uma alteração clínica sugestiva de imunossupressão, como palidez das mucosas e diarreia, não tendo nenhum deles recebido cuidados médico-veterinários. Apesar de estes poderem estar mais suscetíveis, em nenhum foi encontrado um resultado positivo.

Todos os aspetos aqui discutidos parecem apontar para a hipótese de que o vetor e/ou o parasita podem não estar presentes na Ilha de Faro. A ser assim, esta população de gatos não parece estar a atuar como reservatório de *Leishmania donovani* s.l.. Sem dados concretos e esclarecedores sobre a presença/ausência do vetor e/ou do parasita na Ilha de Faro, também não é possível adiantar qualquer hipótese sobre uma eventual resistência natural dos gatos ao protozoário.

Que seja do conhecimento da autora, este projeto tem a particularidade de ser o primeiro a nível mundial que tem como população alvo gatos habitantes de uma península, que apenas se encontra ligada ao continente por uma estrada e por onde não há migração voluntária de animais.

Apesar dos resultados negativos, estes estudos são importantes, não só para aumentar o conhecimento do papel do gato no ciclo de vida de *Leishmania infantum*, mas, também, para aprofundar os conhecimentos do comportamento do parasita que podem ajudar numa profilaxia mais efetiva no futuro, contribuindo para o controlo desta zoonose tão importante em Portugal.

6. Conclusão

A leishmaniose é uma importante parasitose, não só pelo seu potencial zoonótico mas, também, por ser considerada endémica em Portugal.

A melhor maneira de controlar a doença é através da prevenção. Devido à falta de métodos preventivos em gatos, esta é uma área que carece de investigação mais aprofundada.

Em gatos, do ponto de vista clínico, a leishmaniose felina deveria ser considerada com mais frequência na lista de diagnósticos diferenciais, não só em casos de sintomatologia sugestiva, mas, também, nos casos em que o tratamento de outras doenças não esteja a evoluir como esperado, suspeitando-se, assim, de uma doença imunossupressora. É, portanto, fundamental aprofundar os conhecimentos sobre a doença por parte dos médicos veterinários e profissionais envolventes.

No presente trabalho em nenhum dos animais estudados foi encontrado DNA do parasita ou anticorpos anti-*Leishmania infantum*. Apesar dos resultados negativos, o objetivo principal deste trabalho foi atingido, tendo sido importante realizá-lo, uma vez que a população de gatos errantes da Ilha de Faro tem uma dimensão considerável e a presença de infeção por *Leishmania* spp. nunca, antes, havia sido avaliada.

No futuro, este estudo poderia ser continuado e enriquecido através da utilização de outras técnicas de diagnóstico serológico como a ELISA ou uma reação de PCR *nested* que é mais sensível que a PCR convencional (Paltrinieri *et al.*, 2010). Seria, também, muito interessante testar os cães errantes da Ilha de Faro, de forma a averiguar se o hospedeiro principal se encontra infetado/exposto, e avaliar a presença do flebótomo no local.

7. Referências Bibliográficas:

- Afonso, M., & Alves-Pires, C. (2008). Bioecologia dos vetores, *In* Santos-Gomes, G.M, Pereira da Fonseca, I.M. (Eds.), *Leishmaniose canina:Lisboa* (pp. 27-40). Chaves Ferreira Publicações, S.A.
- Agência Lusa. (2014). Ilha de Faro: Esterilizados 161 dos 230 gatos errantes. Diário digital. Acedido a 12 de fevereiro de 2016, em http://diariodigital.sapo.pt/news.asp?id_news=741187
- Ayllon, T., Miguel, A., Tesouro, I. A., Villaescusa, A., Rodriguez-Franco, F., & Sainz, A. (2008). Serological and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from central Spain. *Animal biodiversity and emerging diseases*, 1149, 361-364.
- 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*, 24 (7), 324-330.
- Braga, A. R. C., Langoni, H., & Lucheis, S. B. (2014). Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 20(1), 5.
- Cardoso, L., Lopesa, A., Sherryc, K., Schallig, H., & Solano-Gallego, L. (2010). Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Veterinary Parasitology*, 174, 37-42.
- Chatzis, K. M., Leonidas, L., Athanasiou, L. V., Papadopoulos, E., Kasabalis, D., Mylonakis, M., *et al.* (2014). Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Experimental Parasitology*, 147, 54-9.
- Ramos, Cláudia Patrícia Gonçalves. (2012). A importância da infecção por *Leishmania* spp. E *Dirofilaria immitis* em gatos na região de Olhão. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária.
- Cortes, S.; Rolão, N.; Ramada, J.; Campino, L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.- specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 12-17.

Faria, T.C.P. (2008). Estudo sero-epidemiológico da infecção por *Leishmania infantum* em cães e gatos do Município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

Figueiredo, F.B., Bonna, I.C., Nascimento, L.D., Costa, T.D., Baptista, C., Pacheco, T.M., Amendoeira, M.R., *et al.* (2009). Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira da Medicina Tropical*, 42 (2),141-5.

Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology* 181, 23-30.

Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal of Parasitology*, 35, 11-12.

Giudice, P., & Marty, P. (2003). Cat-associated zoonosis: don't forget rabies and leishmaniasis. *Archives of Internal Medicine*, 163(10), 1238.

Gontijo, B., & Carvalho, M. (2003). American cutaneous leishmaniasis Sciffo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1), 1-15.

Joana Margarida da Cruz Baptista Galvão Garrido. (2012) Contribuição para o estudo de prevalência da infecção por *Leishmania infantum* em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Universidade técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária.

Kirkpatrick, C. E., Farrell, J. P., & Goldschmidt, M. H. (1984). *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Experimental Parasitology* 58, 125-131.

Longoni, S., López-Céspedes, A., Sánchez-Moreno, M., Bolio-Gonzalez, M.E., Sauri-Arceo, C.H., Rodríguez-Vivas, R.I., *et al.* (2012). Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35, 469-476.

Maia, C.; & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection; *Veterinary Parasitology* 158 (8), 274–287.

Maia C., & Campino. L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis?. *Trends in Parasitology*, 27(8), 341-4.

- Maia C. & Campino, L. (2012). Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. *Journal of Tropical Medicine*, 541-571.
- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E., *et al.* (2010). Feline *Leishmania* Infection in A Canine Leishmaniasis Endemic Region, Portugal. *Veterinary Parasitology* 174, 336-340.
- Maia C., Nunes M. & L. Campino. (2008). Importance of cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 8(4), 555-9.
- Maia C., Ramos, C., Coimbra, M., Bastos, F., Martins, A., Pinto, P., *et al.* (2014)a. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasits & vectors*, 7:115.
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Cardoso, L., & Campino, L. (2014)b Prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen and antibodies to *Leishmania infantum* in cats from southern Portugal. *Parasitology international*, 64,154-156.
- Manolis, K. C., Margarita, A., Leonidas, L., Kasabalis, D., Mylonakis, M., Alexandros F. K., *et al.* (2014) Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in diferente tissues of clinically normal and sick cats. *Veterinary Parasitology*, 202, 217-225.
- Maroli, M., Pennisi, M.G., Muccio, T.D., Khoury, C., Gradoni, L., & Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 145, 357-360.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., & Morillas-Márquez, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145, 3-4.
- Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., Garcia, M., *et al.* (2014). Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasites and Vectors*, 24, 7-112.
- Morais, R., Gonçalves, S., Costa. P., Silva, F., Silva, R., Silva, R., *et al.* (2012). Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. *Experimental and Applied Acarology*,59(4), 473-81.
- Nasereddin, A., Salant, H.,& Abdeen, Z. (2008). Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Veterinary Parasitology* 158, 364-369.

- Navarro, J.A., Sánchez, J., Peñafiel-Verdú, C., Buendía A.J., Altimira, J. & Vilafranca, M. (2010). Histopathological Lesions in 15 Cats with Leishmaniosis. *Journal of Comparative Pathology*, 143, 297-302.
- Nieto, C. G., J. Viñuelas, Blanco, A., Garcia-Alonso, M., Verdugo, S.G., & Navarrete, I. (1996) Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine chroid plexus. *The Veterinary Record*, 139(14): 346-347.
- Olivia, G., Roura, X., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., Lubas., G., *et al.* (2010). Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Veterinary Medicine Today: Reference Point*. 236(11), 1192-8.
- Onleish observatório nacional das leishmanioses (2009). Epidemiologia. Acedido em 11 de Maio de 2016 em <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>.
- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Leliève, A., *et al.* (1998). Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Veterinary Parasitology* 75, 273-277.
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, Lai., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., *et al.* (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniosis in dogs. *Veterinary Medicine Today: Reference point*, 236 (11), 1184-91.
- Pinto, Pedro Miguel Faustino. (2013). Prevalência Da Infecção Por *Leishmania* sp. em Gatos Residentes No Conselho De Cascais. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias - Faculdade de Medicina Veterinária.
- Pennisi, M. G. (2002). A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. *In: Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Intervet International Boxmeer* (pp.39-48). R. Killick-Kendrick editors.
- Pennisi, M. G., Hartmann, K., Lloret, A., Addies, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., *et al.* (2013). Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. Clinical review. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15, 638-642.
- Pennisi, M. G. (2014). Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. *Veterinary Parasitology*, 208(1-2), 35-47.
- Pennisi, M. G., Cardoso, L., Baneth, G., Bourdeau, P., Koutinas, A., Miró, G., Olivia, G., *et al.* (2015). *Parasites & Vectors*, 8:302.
- Pereira da Fonseca, I., Saraiva-Marques, C., Basso, A., & Garrido, J. (2013). Leishmaniose Felina. *Medicina veterinária*. Nº67: 15:25.

Pimenta, P., Alves-Pimenta, S., Barros, J., Barbosa, P., Rodrigues, A., Pereira, M.J., *et al.* (2016). *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, (submetido para publicação).

Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A., *et al.* (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*, 106, 181-191.

Quinnell, R. J., & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14), 1915-34.

Rapley, R. (2000). Molecular biology and basic techniques. *In: Wilson, K., Walker, J. (Eds.), Principles and Techniques of Practical Biochemistry* (5th ed., pp. 80-136). Cambridge: Cambridge University Press.

Rennó, A., Braga, C., Langoni, H., & Lucheis, S.B. (2014). Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and Polymerase chain reaction. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20(1), 5.

Rougeron, V., Catzeflis, F., Hidea, M., Meeûs, & Bañuls, A-L. (2011). First clinical case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a domestic cat from French Guiana. *Veterinary Parasitology*, 181, 325-328.

Rüfenacht, S., Sager, H., Müller, N., Schaerer, V., Heier, A., Welle, M. M., *et al.* (2005). Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *The Veterinary record*, 156(17), 542-5.

Salvatore, D., Aureli, S., Baldelli, R., Francesco, A., Tampieri, MP., & Galuppi, R. (2014). Molecular evidence of *Leishmania infantum* in Ixodes ricinus ticks from dogs and cats, in Italy. *Veterinaria Italiana*, 50(4), 307-312.

Sarkari, B., Hatan, G.R., Adnani, S.J., & Asrari, Q. (2009). Seroprevalence of feline leishmaniasis in areas of Iran where *Leishmania infantum* is endemic. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 103(3), 275-277.

Schubach, T. M.P., Figueiredo, F.B., Pereira, S.A., Madeira, M.F., Santos, I.B., Andrade, M.V., *et al.* (2004). American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2004 (98), 165-167.

Sherry, K., Miró, G., Trotta, M., Miranda, C., Montoya, A., Espinosa, C., *et al.* (2011). A Serological and Molecular Study of *Leishmania infantum* Infection in Cats from the Island of Ibiza (Spain). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(3), 239-245.

- Simões-Mattos, L., Mattos, MR., Teixeira, MJ., Oliveira-Lima, JW., Bevilaqua, CM., Prata-júnior, RC., *et al.* (2005). The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 127(3-4), 199-208.
- Sobrinho, L. S., Rossi, C. N., Vides, J. P., Braga, E. T., Gomes, A.A.D., Lima, J.P., *et al.* (2012). Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary parasitology*, 187, 302-306.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M. & Alberola, J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean American *Journal of Tropical Medicine. Hygiene.*, 76, 676-680.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., *et al.* (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), 1-18.
- Solano-Gallego, L., Saz, S.V., Cardoso, L., Esteve, L.O.I., Corrales, G.M., Fondati, A. *et al* (2013). Leishmaniasis: Una revisión actualizada. (pp. 3-14). *Servet editorial: Grupo Asís Biomedica S.L.*
- Trainor, K. E., Porter, B.F., Logan, K.S., Hoffman, R.J., & Snowden, K.F. (2010). Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas. *Veterinary Pathology*, 47(6), 1076-1081.
- Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E & Luciani, A. (2005). Feline leishmaniasis and Ehrlichiosis: Serological Investigation in Abruzzo Region. *Veterinary Research Communications*, 2 (29), 319-321.
- World Health Organization (WHO) (2010). Control of the leishmaniasis: Report of the Who Expert Committee on the Control of Leishmaniasis (versão online). Acedido a 27 de Janeiro de 2016, disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf World Health Organization (WHO) (2010).

8. Apêndice I

Projecto "Gatos da Ilha de Faro"

Identificação do ani _____

Data colheita _____

Idade aproximada Juvenil (< 1 ano) Adulto (> 1 ano) Sênior (>10 anos)

Sexo: M F

Presença de carraça
Não Sim

Presença de pulgas
Não Sim

Sinais clínicos presentes:

	Sim	Não
Lesões dérmicas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Linfadenopatia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lesões oculares	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Atrofia muscular	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Epistáxis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Palidez das mucosas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diarreia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Outros sinais clínicos: _____

Produto recolhido:

	Sim	Não
Sangue em EDTA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sangue em tubo seco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Feces	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Órgãos genitais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pele da Orelha	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Carraças	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pulgas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Outras amostras	_____	