

Micaela Roque Fernandes

Leishmaniose Canina

Orientador: Professor Doutor Eduardo Marcelino

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa 2018

Micaela Roque Fernandes

Leishmaniose Canina:

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 11 de Abril de 2018, perante júri, nomeado pelo Despacho Reitoral nº113/2018, com a seguinte composição:

Presidente: Prof.^a Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Prof. Doutora Ana Maria Munhoz

Orientador: Prof. Doutor Eduardo Marcelino

Vogal: Prof.^a Doutora Maria Margarida Ferreira Alves

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa 2018

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, na pessoa da sua Directora, Prof.^a Doutora Laurentina Pedroso, pela possibilidade de realização desta Dissertação de Mestrado.

Ao professor Dr. Eduardo Marcelino um grande agradecimento pela sua disponibilidade e ajuda ao longo desta tese.

À minha família que me ajudou e incentivou a continuar a lutar ao longo destes seis anos, a qual sei que estão orgulhosos de mim.

Um agradecimento especial ao Dr. Filipe Pereira, diretor clínico do Hospital Veterinário da Mata de Santa Iria que sempre me ajudou e impulsionou ao longo destes anos nesta minha profissão. A toda a equipa do HVMSI um grande obrigado pelos conhecimentos transmitidos e por terem acreditado em mim desde o início: Dra. Inês Silva, Dr. Estevão Reis, Dra. Maria João, á enfermeira Melanie Santos por me terem sempre ajudado ao longo do meu percurso.

À Auxiliar Claudia um especial agradecimento por toda a paciência e carinho, por me ter sempre mostrado que deve haver humildade acima de tudo, pela grande amiga e companheira que ficou para a vida, um grande beijinho.

À Dra. Ana Ramos não há palavras que descrevam o meu agradecimento, todo o carinho, paciência, companheirismo, sempre disposta a ajudar e ensinar, e a grande amiga e colega que ficou para a vida. Espero que tenhas orgulho do meu trabalho e que olhes para mim como uma boa profissional.

Obrigada por todos os bons momentos e pelo estágio fantástico que me proporcionaram.

Aos meus colegas e amigos de curso (a “Família”), que tornaram a aventura da Veterinária tão instrutiva como divertida.

Por último, em especial, à Joana Pereira e Teresa Braga as melhores amigas e companheiras de tudo que podia ter. Muito obrigada! Gosto muito de vocês

Resumo

A leishmaniose canina (LCan), é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida por um insecto flebótomo (*P. perniciosus* e *P. ariasi*), sendo os canídeos os principais hospedeiros reservatório.

O objetivo deste estudo foi caracterizar canídeos com LCan da região de Torres Vedras, em relação ao sexo, idade, raça, estilo de vida e profilaxia, com os dados clínicos do HVMSI, recolhidos durante 1 de Setembro de 2016 e 1 de Março de 2017. Foram também recolhidas informações acerca dos sinais clínicos, alterações laboratoriais, métodos de diagnóstico, quantificação da razão da amostra no momento do diagnóstico e do controlo, tipo de tratamento implementado e mortalidade dos animais afetados.

Os animais afetados corresponderam maioritariamente a indivíduos do sexo masculino (60%), de médio a grande porte (90%), predominantemente de exterior (90%). O seu diagnóstico foi realizado na maioria entre os 4 e os 8 anos de idade (75%), apresentando os animais na altura manifestações clínicas inespecíficas, das quais se destacavam os sinais dermatológicos (75%). Os meios de diagnóstico utilizados foram o Speed Leish K e a serologia ELISA Leiscan .

Conclui-se que é fundamental a sua prevenção, através da sensibilização dos proprietários, realizada pelos Médicos Veterinários.

Palavras-chave: Leishmaniose, Canídeos, Zoonose, Flebótomo, ELISA.

Abstract

Canine leishmaniasis (LCan) is a zoonosis caused by the protozoan *Leishmania infantum* and transmitted by a insect phlebotomine (*P. perniciosus* and *P. ariasi*), the canine being the main reservoir host.

The objective of this study was to characterize canines with LCan in region of Torres Vedras in relation to sex, age, race, lifestyle and prophylaxis, with the clinical data of HVMSI, collected during 1 de Setembro de 2016 e 1 de Março de 2017. Information on clinical signs, laboratory abnormalities, diagnostic methods, sample ratio quantification of diagnosis and control, type of treatment implemented and mortality of affected animals were also collected.

The affected animals corresponded mainly to male (60%), medium to large (90%), predominantly from outdoor (90%). The diagnosis was made mostly between 4 and 8 years old (75%), with the animals presenting at the time non-specific clinical manifestations, of which the dermatological signs (75%) were outstanding. The diagnostic medium used was the Speed Leish K and ELISA Leiscan serology test.

It is concluded that its prevention is fundamental, through the awareness of the owners, carried out by the Veterinary Doctors.

Key words: Leishmaniasis, Dogs, Zoonoses, Phlebotomine, Prevention.

Índice geral

Resumo -----	4
Abstract -----	5
Índice geral -----	6
Índice de tabelas -----	8
Índice de gráficos -----	8
Índice de figuras -----	10
Lista de abreviaturas, símbolos e acrónimos -----	11
Actividades desenvolvidas durante o estágio -----	13
Casuística do estágio -----	13
Leishmaniose Canina -----	17
Etiologia -----	17
Formas parasitárias -----	17
Hospedeiro vertebrado -----	18
Vector biológico -----	19
Ciclo biológico -----	20
Patogenia -----	22
Epidemiologia -----	24
Epidemiologia da leishmaniose em Portugal -----	25
Quadro clínico e lesional -----	27
Alterações de hemograma, análises bioquímicas e urianálise -----	30
Diagnostico -----	30
Diagnostico direto -----	31
Avaliação citológica -----	32
Avaliação histológica -----	32
Cultura de leishmania -----	32
Diagnostico serológico -----	32
IFA -----	33
Teste ELISA -----	34
Imunocromatografia- Testes rápidos -----	35
Diagnostico molecular -----	35
Tratamento -----	37

Alopurinol -----	38
Combinação de antimoniato de meglumina com alopurinol -----	39
Combinação de miltefosina com alopurinol -----	40
Anfotericina B -----	40
Domperidona -----	41
Outros fármacos -----	42
Monitorização -----	43
Controlo e prevenção -----	43
Imunoprofilaxia -----	45
Trabalho experimental -----	46
Objectivos -----	46
Material e metodos -----	46
Resultados -----	47
Discussão -----	54
Conclusão -----	59
Referencias bibliograficas -----	61

Índice de tabelas

Tabela 1 – Consultas observadas por especialidade -----	14
Tabela 2 - Meios complementares de diagnóstico e procedimentos realizados no estágio -----	15
Tabela 3 - Procedimentos efetuados no internamento -----	15
Tabela 4 - Incidência das áreas de cirurgia observadas durante o estágio -----	16
Tabela 5 – Urgências observadas durante o estágio -----	16
Tabela 6 – Sinais clínicos observados em cães sintomáticos com LCan -----	28
Tabela 7 – Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos diagnósticos na detecção de LCan em cães -----	31
Tabela 8 – Equivalência entre a razão da amostra (Rz) do teste comercial Leiscan e o título de IFAT -----	34
Tabela 9 – Estadiamento de LCan baseado no estado serológico, sinais clínicos, achados laboratoriais e tipo de terapia e prognóstico para cada estágio -----	38

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Representação gráfica das frequências relativas das diferentes áreas clínicas ---	13
Gráfico 2 - Distribuição da população quanto ao sexo -----	47
Gráfico 3 - Distribuição da população quanto a idade -----	47
Gráfico 4 - Distribuição da população quanto a raça -----	48
Gráfico 5 - Distribuição da população quanto ao estilo de vida -----	48
Gráfico 6 - Distribuição da população quanto ao tipo de prevenção usada -----	49
Gráfico 7 – Animais da população em estudo vacinados com CaniLeish -----	49
Gráfico 8 - Sinais clínicos apresentados pela população em estudo -----	50
Gráfico 9 - Alterações laboratoriais apresentadas na população em estudo -----	50
Gráfico 10 – Métodos realizados para o diagnóstico na população em estudo -----	51

Gráfico 11 – Quantificação da titulação diagnostica nos animais em estudo -----	51
Gráfico 12 – Tipo de tratamento realizado aos animais afetados -----	52
Gráfico 13 – Controlo analitico dos animais afetados no estudo -----	52
Gráfico 14 – Mortalidade existente nos animais afetados -----	53

Índice de figuras

Figura 1- Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> -----	18
Figura 2- Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> -----	18
Figura 3 - <i>Phlebotomus perniciosus</i> fêmea, alimentando-se de sangue num humano -----	19
Figura 4 - <i>Phlebotomus perniciosus</i> a reproduzir-se -----	19
Figura 5 - Ciclo de vida <i>L. Infantum</i> -----	21
Figura 6- Interação entre as respostas imunitárias Th1 e Th2 na LCan -----	23
Figura 7- Distribuição de LCan na Europa -----	24
Figura 8 - Prevalência de infeção canina por <i>Leishmania</i> em Portugal Continental -----	26
Figura 9 - Sinais clínicos encontrados na LCan -----	27
Figura 10- Fluxograma de abordagem diagnóstica em cães com suspeita de LCan -----	36

Lista de abreviaturas, símbolos e acrónimos

Ac- Anticorpo

Ag- Antigénio

ALT- Alanina aminotransferase

BID – *bis in die* (duas vezes por dia)

DNA- Acido desoxirribonucleico

ELISA – “enzyme-linked immunosorbent assay” (ensaio imunoenzimático)

FAS- Fosfatase alcalina

HV- Hospedeiro vertebrado

HI- Hospedeiro invertebrado

IRC- insuficiencia renal cronica

IRIS- International Renal Interest Society

IFAT – “indirect fluorescent antibody test” (imunofluorescência indireta)

IG – imunoglobulinas

IL – interleucina

IM – intramuscular

IFN – interferão

IV – intravenosa

LCan – leishmaniose canina

LV- Leishmaniose visceral

ON – óxido nítrico

PAAF- Punção aspirativa por agulha fina

PO – *per os* (via oral)

PCR – “polimerase chain reaction” (reação em cadeia da polimerase)

RT-PCR – “real time-PCR” (PCR em tempo real)

SC – subcutânea

SID – *semel in die* (uma vez por dia)

SRD – sem raça definida

Th – “T helper cells” (células T auxiliares)

TNF – “tumoral necrosis factor” (fator de necrose tumoral)

TGF – “transforming growth factor” (fator de crescimento transformador)

UPC – rácio proteína-creatinina

I. Atividades desenvolvidas no estágio curricular

De 1 de Setembro de 2016 a 1 de Março de 2017 foi realizado o estágio curricular no Hospital Veterinário da Mata de Santa Iria, em Torres Vedras, na área da clínica médica e cirúrgica de animais de companhia, sob orientação da Dra. Ana Ramos. Os objetivos principais deste estágio foram integrar uma equipa hospitalar, de modo a aplicar os conhecimentos teóricos e práticos, bem como aprofundá-los. Foi atribuído um horário rotativo, incluindo fins-de-semana e feriados. Durante os 6 meses de estágio realizados no HVMSI, foi possível o envolvimento na prática clínica diária do hospital e a integração nos serviços de internamento, urgências, consultas e cirurgia. Houve oportunidade de estar presente durante a abordagem diagnóstica, bem como na discussão de diferentes casos clínicos.

1. Casuística do estágio

Durante o estágio houve a oportunidade de assistir a consultas de diversas especialidades, tratamentos ou imunoprofilaxias. Das intervenções nas diferentes áreas clínicas, 63% correspondem a patologia médica, 26% a patologia cirúrgica e 11% a medicina preventiva (Gráfico 1).

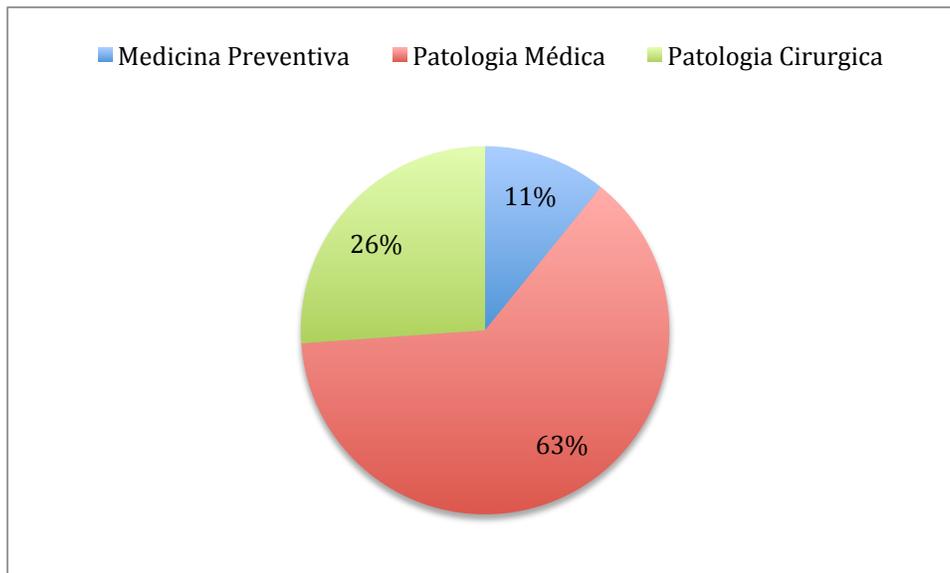


Gráfico 1 - Representação gráfica das frequências relativas das diferentes áreas clínicas.

Foram acompanhadas consultas de ortopedia, imunoprofilaxia, gastroenterologia, fisioterapia e reabilitação, endocrinologia, dermatologia, pneumologia, nefrologia, oncologia, cardiologia, neurologia, estomatologia, oftalmologia, reprodução e exóticos.

Tabela 1 – Consultas observadas por especialidade.

Consultas	Porcentagem
Ortopedia	25%
Imunoprofilaxia	15%
Gastroenterologia	10%
Fisioterapia e reabilitação	9%
Endocrinologia	7%
Dermatologia	6%
Pneumologia	5%
Nefrologia	5%
Oncologia	4%
Cardiologia	4%
Neurologia	4%
Estomatologia	2%
Oftalmologia	2%
Reprodução	1%
Exóticos	1%
Total	392 procedimentos

Na área da cirurgia foi possível assistir e participar como auxiliar de cirurgião e/ou anestesista em cirurgias de tecidos moles, dentárias e ortopédicas.

Para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo é imprescindível a realização de exames complementares. Assim, era comum, durante as consultas, internamento ou na monitorização de um animal, ser requerido a realização de exames complementares, sendo o hemograma/bioquímicas, radiografias, ecografias abdominais e testes rápidos, os tipos de exames mais requisitados (tabela 2). De realçar que o HVMSI dispunha de quase todos os equipamentos de análises sanguíneas, contudo análises muito específicas (por exemplo, culturas, testes de sensibilidades aos antibióticos e exames histopatológicos) eram enviadas para um laboratório externo.

Tabela 2 - Meios complementares de diagnóstico e procedimentos realizados no estágio.

Exame complementar ou procedimento de diagnóstico	Percentagem
Análises sanguíneas (Hemograma/Bioquímicas)	40%
Radiografia	36%
Ecografia abdominal	5%
Snapshots (Testes rápidos)	5%
Urianálise	4%
Electrocardiograma	3%
Citologia	2%
PAAF	2%
Raspagem de pele	1%
Ecocardiograma	1%
Lâmpada de Wood	0,5%
Biópsia	0,5%
Total	550 procedimentos

Os procedimentos do internamento variavam consoante o caso clínico do animal, sendo necessário por vezes recorrer a exames complementares, mas em todos os animais eram realizados três exames físicos por dia para melhor avaliar o seu estado físico e alterações que pudessem surgir. Este exame físico consistia na avaliação dos seguintes parâmetros: estado mental, temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória, pulso, tempo de repleção capilar, estado de hidratação e grau de dor (avaliado de 0 a 10). Dos procedimentos realizados no internamento, os mais comuns passavam pelas medicações injectáveis, exame físico, colheita de sangue e colocação de cateteres (tabela 3).

Tabela 3 - Procedimentos efetuados no internamento.

Procedimento	Percentagem
Medicação IV/IM/SC	35%
Exame físico	29%
Colheita de sangue	18%
Colocação de catéter	12%
Alimentação	3%
Transfusão de sangue	1%
Algaliação	1%
Outros	1%
Total	780 procedimentos

Na área da cirurgia, houve uma incidência maior da cirurgia de tecidos moles e ortopedia, ficando a cirurgia dentária e oftalmológica com um menor número de casos (Tabela 4).

Tabela 4 - Incidência das áreas de cirurgia observadas durante o estágio.

Cirurgia	Percentagem
Tecidos Moles	61%
Ortopedia	30%
Dentária	7%
Oftalmologia	2%
Total	98 Cirurgias

Grande parte das urgências recebidas durante este estágio surgiram devido a cães e gatos que sofreram traumatismos por veículos motorizados, reações de hipersensibilidade (como por exemplo reação vacinal ou contacto com lagarta do pinheiro), abdómen agudo e afogamentos (Tabela 5).

Tabela 5 - Urgências observadas durante o estágio.

Urgência	Percentagem
Traumatismos	30%
Contacto com lagarta do pinheiro	17,5%
Reação hipersensibilidade	15%
Abdómen agudo	12,5%
Afogamentos	12,5%
Dispneia	7,5%
Outros	5%
Total	40 urgências

II. Leishmaniose Canina

1. Etiologia

A leishmaniose é uma zoonose originada por um protozoário, pertencente ao Reino Protista, Classe Kinetoplastea, Subclasse Metakinetoplastina Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae, Subfamília Leishmaniinae e Género *Leishmania* (Akhoudi *et al.*, 2016).

O género *Leishmania* divide-se em três subgéneros, *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania*, que são diferenciados pela localização da sua multiplicação no trato digestivo do inseto vetor. (The Center for food security & public health (CFSPH), 2009; Cupolillo *et al.*, 2000). Com base no desenvolvimento no intestino do mosquito, são classificados nos subgéneros *Leishmania* (ex: *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*) que se replica no intestino médio, e *Viannia* (ex: *L. braziliensis*, *L. peruviana*), que se replica no intestino grosso (Saridomichelakis, 2009).

Estão descritas mais de 30 espécies, sendo que cerca de 20 são consideradas patogénicas para os humanos e 10 para os cães, incluindo *L. infantum* (*L. chagasi*), *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. arabica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. peruviana* e *L. colombiensis* (Saridomichelakis, 2009). A infeção canina mais amplamente distribuída e bem caracterizada é causada pela *L. infantum* que pertence ao complexo *L. donovani* e infeta cães e seres humanos, principalmente em países mediterrânicos, África Ocidental, Ásia do Sul, América Latina e EUA (Saridomichelakis, 2009). O género *L. infantum* é muito provavelmente descendente da *L. donovani* que surgiu na África Ocidental, enquanto *L. chagasi* é considerada a mesma espécie que foi introduzida no Novo Mundo (Saridomichelakis, 2009). O complexo *L. donovani* e a *L. tropica* são geralmente os responsáveis pelo aparecimento da Leishmaniose Visceral (LV) nos humanos, que ocorre por transmissão antroponótica, isto é, a transmissão acontece entre pessoas, através do vetor (Maroli *et al.*, 2012).

As três formas de leishmaniose mais frequentes no homem são a leishmaniose cutânea, a leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose visceral (Rosypal, 2005).

1.1 - Formas parasitarias

O género *Leishmania* é um protozoário dimórfico caracterizado pela presença de um núcleo e um cinetoplasto intracelular, que corresponde ao DNA mitocondrial (Gramiccia, 2011).

Durante o seu desenvolvimento passa por duas formas principais: promastigota (Figura 1), que é extracelular, flagelada e encontra-se no intestino do inseto vetor e amastigota (Figura 2), que é intracelular, aflagelado e é a forma que parasita os macrófagos do mamífero hospedeiro (Tomás & Romão, 2008).

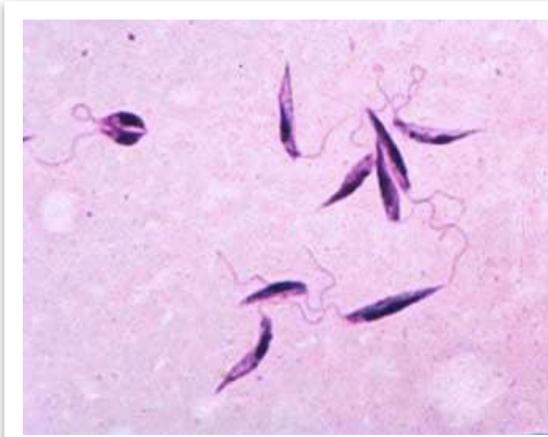


Figura 1- Formas promastigotas de *Leishmania* (ampliação x1000 e coloração May-Grunwald-Giemsa) (Solano-Gallego et al., 2011).

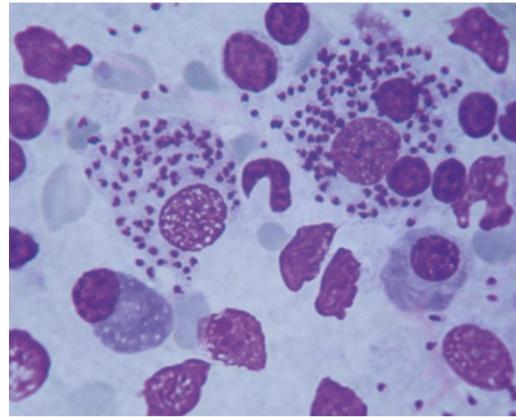


Figura 2- Formas amastigotas de *Leishmania* (ampliação x100 e coloração Giemsa modificado) (Solano-Gallego et al., 2011).

1.2 - Hospedeiro vertebrado

Os cães domésticos (*Canis familiaris*) são os principais hospedeiros reservatórios envolvidos na propagação da LV, que ocorre principalmente devido à transmissão de *L. infantum* (CVBD, 2013).

O cão é considerado um bom hospedeiro reservatório, uma vez que partilha do mesmo habitat do homem e tem um contacto frequente com flebótomos (Abranches et al., 1998). No Novo Mundo, podemos encontrar diversos mamíferos silvestres como hospedeiros reservatório de *L. infantum*: Opossum (*Didelphis spp.*), Preguiça-comum (*Bradypus variegatus*), Daimão-do-cabo (*Procyon capensis*), Raposa comum (*Vulpes spp.*), Lobo-cinzento (*Canis lupus*), Raposa-do-campo (*Dusicyon vetulus*), Cachorro do mato (*Speothos venaticus*), Rato-negro (*Rattus rattus*), Morcego (*Carollia perspicillata*). No Velho Mundo, encontram-se outros mamíferos silvestres hospedeiros reservatórios, como o Chacal-dourado (*Canis aureus*), Lobo-cinzento (*Canis lupus*), Raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*), Raposa-das-estepes (*Vulpes corsac*), Chacal-dourado (*Canis aureus*), Feneco (*Vulpes zerda*), Texugo-europeu (*Meles meles*), Gineta (*Genetta genetta*), Lince-ibérico (*Lynx pardinus*), Sacarrabos (*Herpestes ichneumon*); Foca-monge-do-mediterrâneo (*Monachus monachus*);

Ratazana (*Rattus norvegicus*), Hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*), Hamster-cinzento (*Cricetulus migratorius*), Porco-espinho (*Hystrix spp.*) entre outros (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Dantas-Torres, 2007; Pereira, 2008).

Recentemente, o cavalo e o gato também foram implicados na transmissão deste parasita. A infecção no gato doméstico (*Felis silvestris catus*) tem sido encontrada em países como Portugal, França, Espanha, Itália, Argélia, Brasil, Texas, América do Sul, Grécia, Suíça, entre outros (Coelho et al., 2010; Trainor et al., 2010). Ainda há poucos estudos efetuados nestes animais e a sua categorização como hospedeiro reservatório permanece inconclusiva (Maia & Campino, 2011). Também foram descritos casos de leishmaniose equina na Europa causados por *L. infantum* (Gramiccia & Gradoni, 2005; Rolão, Martins, João & Campino, 2005). A leishmaniose equina caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas com acumulação massiva de parasitas e ausência de anticorpos (Ac) específicos. Estes animais recuperam espontaneamente (Mancianti, 2004), pelo que parecem ter uma resposta clínica e imunológica de resistência à infecção, concluindo-se que se tratam apenas de hospedeiros acidentais (Gramiccia & Gradoni, 2005).

1.3 - Vetor biológico

O vetor que transmite a doença pertence à Classe *Insecta*, Subclasse *Pterygota*, Ordem *Diptera*, Subordem *Nematocera*, Família *Psychodidae* e Subfamília *Phlebotominae*. São reconhecidos seis géneros, mas apenas dois têm importância médica, o género *Phlebotomus* (Figura 3 e 4) no Velho Mundo e *Lutzomya* no Novo Mundo (Gramiccia, 2011).

São insetos dípteros, de cor castanha ou acinzentada, que medem entre 2 a 3 mm, podendo atingir os 5mm, têm olhos grandes e seis membros. As asas são castanhas, longas, aveludadas e mantêm-se erectas sobre o tórax quando estão em repouso. Possuem um aparelho bucal comprido (Afonso & Alves-Pires, 2008; WHO, 2014).



Figura 3 - *Phlebotomus perniciosus* fêmea, alimentando-se de sangue num humano (Maroli et al., 2008)



Figura 4 - *Phlebotomus perniciosus* a reproduzir-se (Maroli et al., 2008).

A distribuição geográfica destes insetos depende essencialmente do tipo de vegetação, clima e composição dos solos. Têm maior atividade quando as temperaturas estão entre os 15°C e os 28°C, associadas a humidades relativas altas e a ausência de chuva ou vento. Deste modo, estão mais ativos nos meses quentes, de abril a outubro (entre a primavera e o outono) em países como Portugal (Greene, 2006, Sharma & Singh, 2008). Já nas regiões tropicais e subtropicais, o seu ciclo gonotrófico ocorre ao longo de todo o ano (Sharma & Singh, 2008). Apesar de apresentarem voos irregulares e breves, podem percorrer distâncias até 2.5 km, tendo maior atividade no período crepuscular ou noturna e apresentando fototropismo positivo (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Os machos e fêmeas são fitófagos, ingerindo sucos vegetais provenientes de plantas ou de outros insetos (afídeos) (Afonso & Alves-Pires, 2008). Apenas as fêmeas são hematófagas e potencialmente infetantes para um hospedeiro (Maroli et al., 2012).

As fêmeas têm um período de vida entre duas a seis semanas. Se a fêmea se infetar entre 4 a 25 dias antes da refeição no hospedeiro vertebrado (HV), pode inocular formas promastigotas (Saridomichelakis, 2009). Durante a refeição de sangue, é inoculada no local da picada no HV, a saliva dos flebótomos, que contém vasodilatadores, anticoagulantes e imunomoduladores, que promovem a infeção no HV (Saridomichelakis, 2009; Rosypal, 2005). Os locais preferenciais para realizar as suas refeições no HV são o focinho, pálpebras, pavilhão auricular, dorso, coxas e dígitos (Saridomichelakis et al., 2009).

Segundo um estudo realizado em Portugal na Serra da Arrábida (Setúbal), em que foram recolhidos 665 flebótomos, 13,83% eram *Phlebotomus ariasi*, 58.65% *P. perniciosus* e 0.45% *P. sergenti*. Este estudo refere ainda que nos distritos de Évora e Faro, a percentagem de *P. sergenti* é muito maior, sendo este o responsável pela transmissão de *L. tropica* (Afonso & Campino, 2005).

1.4 - Ciclo biológico

O ciclo de vida da *Leishmania spp.* (Figura 5) é heteroxeno e composto por duas fases. A fase amastigota, que se encontra dentro das células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, mais concretamente nos macrófagos e a fase promastigota, que se encontra no intestino, glândulas salivares e aparelho bucal do hospedeiro invertebrado (Gramiccia & Gradoni, 2007, 2011; Gluenz, Ginger, & McKean, 2010). A transmissão da infeção

ocorre quando uma fêmea de flebótomo pica um mamífero e realiza uma refeição sanguínea. Esta, ao alimentar-se do sangue de um animal infetado, ingere macrófagos contendo a forma amastigota que por divisão binária se multiplica em larga escala no HV. Estando no interior do intestino do vetor, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, num processo que pode durar entre seis a dez dias, de acordo com as espécies de *Leishmania* e de *Phlebotomus*. (Tomás & Romão, 2008).

Posteriormente, as formas promastigotas dirigem-se para o hipóstoma do flebótomo fêmea e são inoculadas na pele do HV, durante a sua refeição. As promastigotas são seguidamente fagocitadas pelos macrófagos, transformam-se em formas amastigotas e multiplicam-se no interior dos fagolisossomas, provocando a rutura dos macrófagos, e conseqüentemente a libertação de amastigotas e possibilidade de infeção de outras células do organismo. A infeção dissemina-se da pele para os vários órgãos internos devido à mobilidade dos macrófagos infetados ou da presença de formas amastigotas no sistema circulatório. Posteriormente, o vetor infeta-se durante a sua refeição de sangue devido à ingestão de formas amastigotas de um HV infetado, perpetuando o ciclo do parasita e a infeção (Rosypal, 2005).

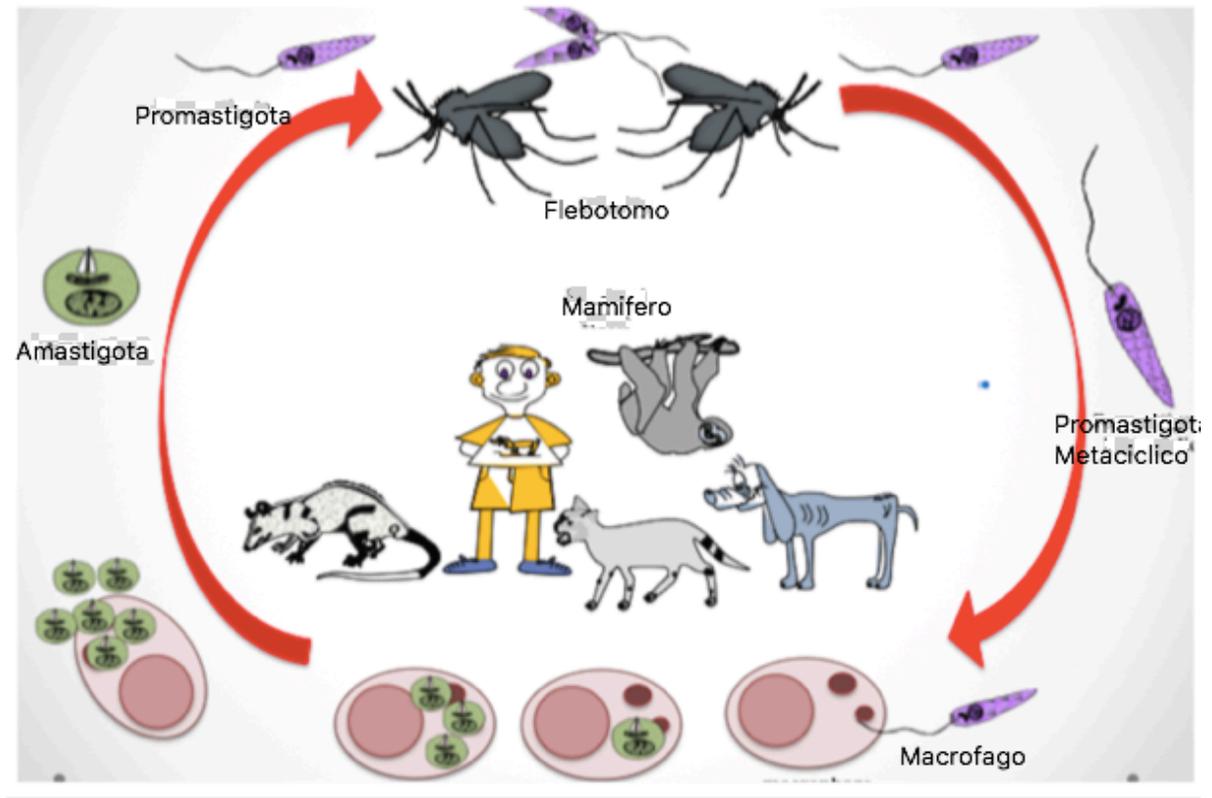


Figura 5 - Ciclo de vida *L. infantum* (Carreira et al., 2014).

1.5- Patogenia

O género *Leishmania spp.* pode infetar muitos tipos diferentes de células, incluindo as do sistema fagocítico mononuclear (por exemplo, macrófagos, células de Kupffer), células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos, eosinófilos e até células neoplásicas (por exemplo, células tumorais venéreas transmissíveis) e assim invadirem quase todos os tecidos e órgãos do corpo, incluindo o sistema nervoso central. Embora a infeção das células não fagocíticas possa contribuir para a sobrevivência do parasita a longo prazo, raramente é produtiva. Assim, os fagócitos mononucleares, especialmente os macrófagos, são consideradas as principais células hospedeiras do parasita (Saridomichelakis, 2009).

O infeção dos macrófagos começa após a inoculação das promastigotas na derme, onde se origina uma reação inflamatória localizada que vai atrair macrófagos, histiócitos, monócitos e neutrófilos que, por sua vez, iniciam a fagocitose das formas parasitárias presentes. Após a fagocitose, o parasita dissemina-se por via hemática e linfática por todo o organismo, preferencialmente para o baço, linfonodos, fígado, pele, rins e medula óssea (Moreno et al., 1999).

Os macrófagos são ativados para eliminar as *leishmanias* através do interferão gama (IFN- γ), que é produzido pelos linfócitos T. Nos cães infetados ocorre uma resposta celular mista, entre os linfócitos T *helper* (linf. Th) do tipo 1 e do tipo 2. Quando a resposta tende para os linf. Th1, o animal não apresenta doença, enquanto que quando a resposta é dos linf. Th2, o animal adocece e apresenta sinais clínicos. Os linf. Th1, através da produção de várias citocinas, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-2 e IFN- γ , induzem os macrófagos a produzir óxido nítrico (NO), que por sua vez, induz a apoptose celular e elimina o parasita (Baneth et al., 2008; Koutinas & Koutinas, 2014).

A resposta dos linf. Th2, resulta na secreção da IL-4, IL-10 e factor transformador do crescimento (TGF) e numa significativa produção de Ac, devido à estimulação de linfócitos B (linf. B) e plasmócitos que permitem a suscetibilidade e a progressão da doença. A IL-10 está relacionada com a carga parasitária e a severidade dos sinais clínicos da doença, regulando a atividade dos linf. Th1 que mantêm o balanço entre as respostas imunitárias Th1 e Th2 e inibindo a atividade microbicida dos macrófagos infetados. A IL-4 está envolvida na diferenciação de linf. Th2 e na proliferação e diferenciação de linf. B (Baneth et al., 2008;

Barbiéri, 2006; Koutinas & Koutinas, 2014).

Os macrófagos infectados são alvo de lise por parte dos linfócitos T CD8+. A figura 6 resume a resposta imunitária na infecção por LCan (Figura 6).

A resposta imunitária humoral, que é mediada pelos Ac que são produzidos pelos linf. B, está associada à doença, uma vez que os Ac não possuem função protetora para o hospedeiro. Os Ac conseguem induzir a fagocitose mas não provocam a morte intracelular das amastigotas, comprometendo deste modo o controlo da infecção (Saridomichelakis, 2009). A produção contínua de Ac causa hiperglobulinemia, o que resulta na formação e deposição de imunocomplexos que podem causar glomerulonefrites, poliartrites, vasculites e meningites, assim como a produção de Ac contra plaquetas e células da linha vermelha (Paltrinieri et al., 2010).

Factores como a imunossupressão e doenças concomitantes podem quebrar o equilíbrio imunitário dos animais assintomáticos e levar ao desenvolvimento de doença (Solano-Gallego et al., 2009). Entre as doenças concomitantes que influenciam as manifestações clinicopatológicas da leishmaniose incluem-se a erliquiose, babesiose, anaplasmosse, bartonelose, hepatozoonose, dirofilariose, espirocercose, demodicose, sarna sarcóptica, pênfigos foliáceo, lúpus sistémico eritematoso, hipotireoidismo, hemangiossarcoma, linfoma, mieloma, histiocitoma e tumor venéreo transmissível (Saridomichelakis, 2009).

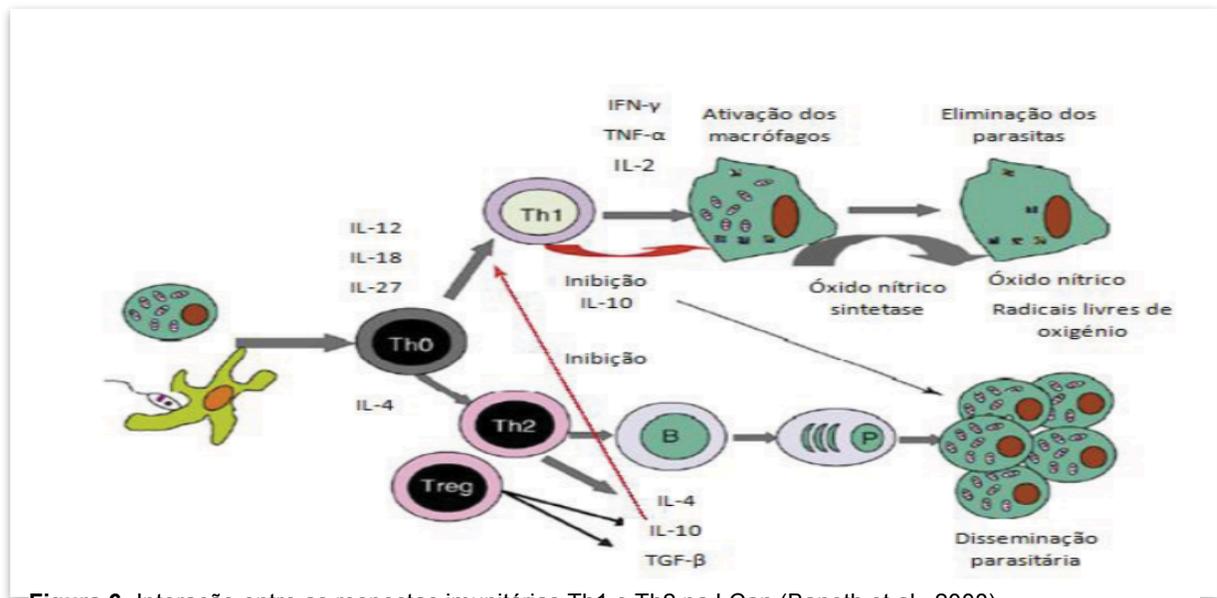


Figura 6- Interação entre as respostas imunitárias Th1 e Th2 na LCan (Baneth et al., 2008).

1.6 - Epidemiologia

A LCan é uma zoonose global potencialmente fatal para humanos e cães, constituindo estes últimos o principal reservatório de infecção para humanos. A LCan é endêmica em mais de 70 países no mundo. Presente nas regiões do sul da Europa, África, Ásia e Américas, com exceção da Antártica, espécies de *Leishmania* foram relatadas em todos os continentes (Baneth et al., 2008).

Nem todos os cães infetados desenvolvem doença, podendo existir respostas imunitárias diferentes. Alguns animais permanecem infetados e assintomáticos durante um período superior a cinco anos (Baneth et al., 2008). Os canídeos domésticos têm um papel preponderante como hospedeiro reservatório, na amplificação dos ciclos de vida das leishmanias à volta da Bacia do Mediterrâneo (Figura 7) e restantes regiões do Mundo onde a doença seja endêmica (Dereure, Pratlong & Dedet, 1999).



Figura 7- Distribuição de LCan na Europa (Solano-Gallego, 2011).

Quanto às vias de transmissão da doença, os flebótomos têm um papel principal na manutenção da infecção, geralmente ocorrendo doença nos locais onde estes estejam presentes (Baneth et al., 2008). Foi colocada a hipótese de outros ectoparasitas hematófagos, como as pulgas e os ixodídeos, serem também infetantes, mas ainda não existem certezas quanto ao seu papel na transmissão. Outras vias de transmissão poderão ser a transplacentária, através de uma gestação resultante de um cruzamento onde ambos os cães estão infetados (Rosypal et al., 2005) ou apenas a progenitora (Masucci et al., 2003) e a via sexual (Silva et al., 2009). A infecção por meio de transfusão sanguínea, também foi descrita (Owens et al., 2001). Todas

estas vias de transmissão podem ser importantes, em áreas em que a LCan tenha sido reportada na ausência de flebótomos, como no Norte da América e no Norte da Europa (Maroli et al., 2010).

Em áreas endémicas, diversos fatores relativos ao hospedeiro (como o sexo, idade, genética, estado nutricional ou infeções concomitantes), assim como a virulência da estirpe de *Leishmania*, desempenham um papel na resposta do cão à infeção. Para certos autores o sexo não é relevante (Ciaramella et al., 1997) para outros os machos têm maior propensão para a doença (Miranda et al., 2008). Em relação à idade, estão referidos dois picos de prevalência da doença, antes dos 2 e após os 8 anos de idade (Cardoso et al., 2004; Solano-Gallego et al., 2011). Todas as raças são suscetíveis à infeção, embora algumas, como o Boxer, Labrador Retriever, Cocker Spaniel, Rottweiler, Pastor Alemão, Beagle e Mastim Napolitano, parecem ser mais suscetíveis, enquanto outras, como o Cão Podendo de Ibiza, raramente desenvolvem sinais clínicos de LCan (Baneth et al., 2008; Cortes et al., 2012; Solano-Gallego et al., 2011). O gene *Slc11c1* e alguns alelos dos genes do MHC II foram associados à susceptibilidade à LCan (Solano-Gallego et al., 2011).

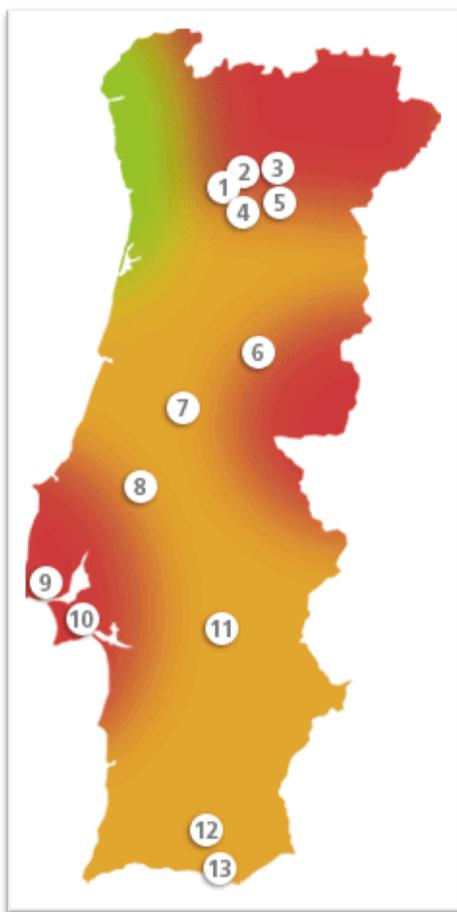
1.7 - Epidemiologia da leishmaniose em Portugal

Em Portugal a leishmaniose humana é uma doença predominantemente infantil, sendo as espécies vetoras *P. perniciosus* e *P. ariasi*. Contudo, nos últimos anos, começou a haver uma alteração desta tendência e a registar-se um maior número de casos em adultos, principalmente associados a casos de Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (Campino & Maia, 2010).

O número de casos de LCan em Portugal tem vindo a aumentar, com uma prevalência de cerca de 20% em localidades de regiões endémicas (Campino & Maia, 2010). Atualmente em Portugal, com base em estudos de seroprevalência, podem ser consideradas endémicas as regiões de Trás-os-Montes e Alto Douro, a sub-região da Cova da Beira, o distrito de Coimbra, a região de Lisboa e Setúbal, o distrito de Évora, a região do Algarve (Campino et al., 2006; Campino & Maia, 2010) e os distritos de Portalegre, Beja e Castelo Branco (Cortes et al., 2012). Segundo um estudo epidemiológico realizado em Portugal, em que a amostra foi de 3974 cães de 18 distritos e que tinha como objetivo identificar os factores de risco associados à LCan, verificou-se que cães com mais de 2 anos, com estilo de vida no exterior e residentes no interior do país eram mais susceptíveis de ser seropositivos e a seroprevalência no período da transmissão (entre maio e outubro) foi de 6,3% (Cortes et al., 2012).

Cortes et al realizaram também um inquérito epidemiológico canino na área urbana/sub-urbana da Grande Lisboa, encontrando uma prevalência de infeção de 19,2%. Os autores associaram este valor com o desenvolvimento não planeado das zonas sub-urbanas, responsáveis pelo aumento dos resíduos sólidos que atraem os cães, tornando-os mais susceptíveis à picada do inseto vetor e consequente transmissão da doença. Na região do Algarve, a prevalência de infeção é de 7% (Cortes et al., 2007; Campino & Maia, 2010).

Segundo o grupo da OnLeish a Figura 8 demonstra a prevalência de infeção por *Leishmania* em Portugal.



Concelho/Distrito	Prevalência e respetivo ano
1 – Concelho de Mesão Frio	15% em 1989
2 – Concelho de Santa Marta de Penaguião	9,4% em 1989
3 – Concelho de Alijó	10% em 1986-1987; 12,4 % em 1988-1989; 18,7% em 2000
4 – Concelho de Tabuaço	6,5% em 1996
5 – Concelho de Peso da Régua	10% em 1989; 20,4% em 1999
6 – Concelhos de Fundão, Covilhã e Belmonte	12,5% em 2005
7 – Concelho de Lousã	6,2% em 1994
8 – Concelho de Santarém e Alcanena	10,3% em 2006
9 – Distrito de Lisboa	5,2% em 1981; 19,2% em 2003
10 -Distrito de Setubal	7,8% em 1981-1986; 21,3% em 2003
11 - Concelho de Évora	3,9% em 1991; 9,4% em 1999-2000
12 - Concelho de Loulé	7% em 1994
13 – Distrito de Faro	7% em 1993-1994

Figura 8 - Prevalencia de infeção canina por *Leishmania* em Portugal Continental (OnLeish).

1.8 - Quadro clínico e lesional

O período de incubação da LCan pode variar entre 3 meses e 7 anos (Miró et al., 2008). É uma doença sistêmica que pode potencialmente envolver qualquer órgão, tecido ou fluidos corporais e é manifestada por sinais clínicos não específicos (Solano- Gallego et al., 2011). As características clínicas da leishmaniose variam largamente em consequência dos mecanismos patogênicos no processo de doença, dos diferentes órgãos afetados e da diversidade da resposta imunitária iniciada pelo hospedeiro (Solano- Gallego et al., 2009).

A imagem típica da LCan reflete geralmente uma disfunção orgânica múltipla, podendo observar-se diversos sinais clínicos. Porém, muitos cães podem apresentar-se somente com uma manifestação clínica (Koutinas et al., 1999). Alguns dos sinais clínicos mais comuns podem ser observados na Figura 9, sendo os mais frequentes referidos na Tabela 6.

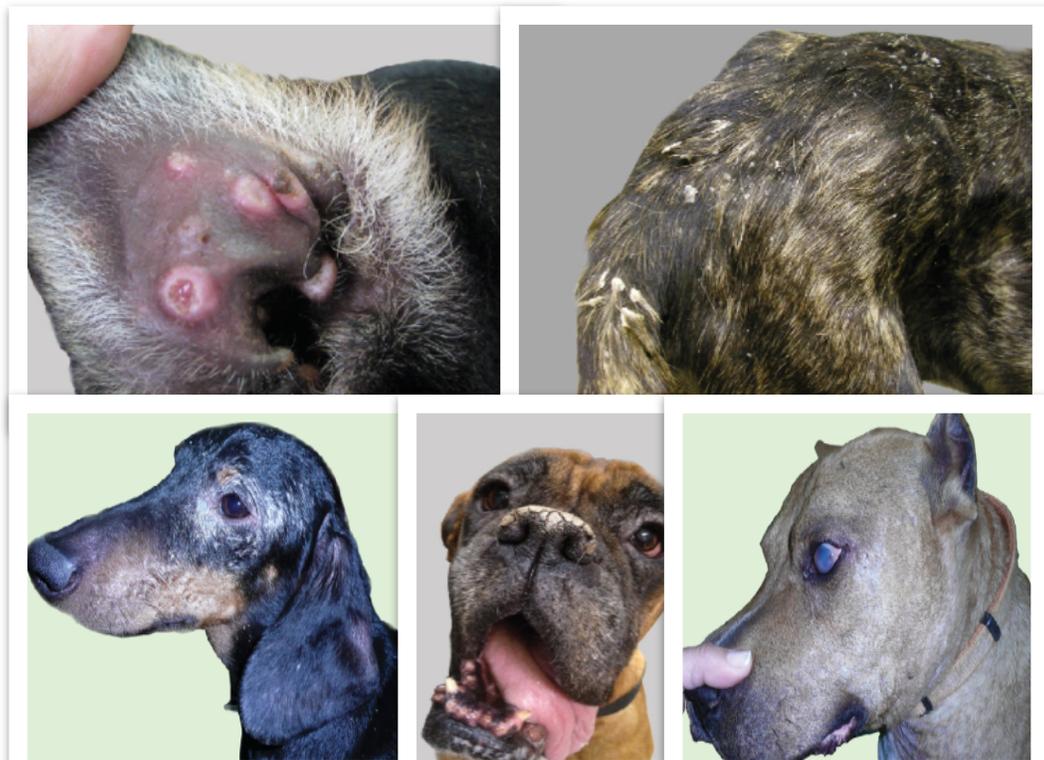


Figura 9 - Sinais clínicos encontrados na LCan.

A- Dermatite papular ulcerativa; **B-** Dermatite exfoliativa; **C-** Alopecia periorbital e dermatite facial exfoliativa; **D-** Hiperqueratose nasal; **E-** Uveíte. (Adaptado de LeishVet).

Tabela 6 – Sinais clínicos observados em cães sintomáticos com LCan (Baneth et al., 2008).

Sinais Clínicos LCan observados	Percentagem de cães sintomáticos(%)
Caquexia	10% a 48%
Doenças cutanêas	81% a 89%
Doenças oculares	16% a 81%
Epistaxis	6% a 10%
Esplenomegalia	10% a 53%
Febre	4% a 36%
Linfadenomegalia	62% a 90%
Mucosas pálidas	58%
Onicogribose	20% a 31%

A maior parte dos cães apresenta uma condição corporal baixa, atrofia muscular generalizada, linfadenomegalia e descamação excessiva da pele. O achado histopatológico típico nos tecidos é uma reação inflamatória granulomatosa associada à presença de amastigotas de *Leishmania* nos macrófagos (Baneth et al., 2008).

As alterações cutanêas mais comuns são a dermatite exfoliativa, ulcerativa, nodular e pustular e a presença de onicogribose, que está associada a uma dermatite mononuclear liquenoide (Baneth et al., 2008; Saridomichelakis, 2009).

A linfadenopatia é outro dos sinais clínicos mais frequentes na LCan, e caracteriza-se por um aumento do tamanho dos linfonodos, sendo os linfonodos pré-escapulares e poplíteos os mais afetados (Koutinas et al., 1999). Em estádios mais avançados da doença, em que o animal já apresenta insuficiência renal, os linfonodos podem estar normais ou hipoplásicos, acompanhados de uma perda de condição corporal (Saridomichelakis, 2009).

A esplenomegalia é geralmente subclínica, sendo necessário o uso de exames complementares, como a radiografia e a ecografia, para ser identificada (Koutinas et al., 1999). Esta condição patológica deve-se à proliferação e infiltração de células imunitárias e à hiperplasia associada à polpa branca e vermelha por alterações estruturais microvasculares (Saridomichelakis, 2009).

É essencial avaliar a função renal e classificar o estágio da doença renal, segundo as recomendações da IRIS, uma vez que a LCan está associada a uma elevada prevalência de insuficiência renal crónica (IRC) (Solano-Gallego et al., 2009). A doença renal pode progredir de

proteinúria assintomática para síndrome nefrótica ou IRC com glomerulonefrite, nefrite tubulointersticial e raramente para amiloidose (Baneth et al., 2008). A glomerulonefrite está associada à deposição renal de imunocomplexos dentro das estruturas que compõem os glomérulos (Baneth et al., 2008; Saridomichelakis, 2009). As lesões renais explicam a proteinúria e podem causar hipertensão, que por sua vez resulta num ciclo vicioso, agravando a patologia glomerular, provocando uma síndrome nefrótica e IRC, sendo esta a causa mais comum de morte devido à leishmaniose (Baneth et al., 2008; Saridomichelakis, 2009).

As alterações articulares e ósseas também podem estar presentes em cães infetados. Um estudo sobre lesões esqueléticas em LCan descreve que, de 58 cães com LCan, 45% apresentavam alterações na marcha. Tanto na poliartrite erosiva, quanto na não-erosiva, foram observadas, por microscopia, formas amastigotas de *Leishmania* no líquido sinovial. Estas poliartrites devem-se à presença do próprio parasita, à circulação de imunocomplexos ou ao depósito de ambos na membrana sinovial (Baneth et al., 2008; Koutinas et al., 1999). A poliartrite não é a única causa de claudicação num cão com LCan. Lesões ósseas e das almofadas plantares, polimiosite e neuralgia são causas adicionais (Baneth et al., 2008; Saridomichelakis, 2009).

A atrofia muscular progressiva está associada à polimiosite crónica caracterizada pela presença de infiltrados mononucleares com amastigotas de *Leishmania*, vasculite neutrofílica e depósitos de imunocomplexos de IgG nos tecidos musculares, bem como pela produção de Ac contra as miofibrinas (Baneth et al., 2008; Saridomichelakis, 2009).

As alterações oculares estão presentes em 16% a 80% dos cães com LCan. Estas consistem em uveíte anterior, conjuntivite, queratoconjuntivite seca, blefarite ou uma combinação destas lesões. Na queratoconjuntivite seca, infiltrados inflamatórios localizados em torno dos ductos lacrimais causam retenção da secreção e uma diminuição da produção de lágrima (Baneth et al., 2008).

Alterações hemorrágicas tais como, epistaxis, hematúria e diarreia hemorrágica estão descritas na LCan (Baneth et al., 2008; Ciamarella et al., 2005). A epistaxis pode ser aguda ou crónica/recorrente, unilateral ou bilateral, ocorrendo devido a trombocitopatia, trombocitopénia, hiperglobulinémia, rinite ulcerativa e vasculites (Baneth et al., 2008; Koutinas & Koutinas, 2014). As desordens hemostáticas primárias e secundárias podem ser mais evidentes em cães sintomáticos, nos quais o estado imunitário está comprometido, um processo inflamatório persistente ou lesão hepática ou renal podem influenciar a função plaquetária e a síntese e metabolismo dos fatores de coagulação (Ciamarella et al., 2005). A anemia está presente na maioria dos cães sintomáticos devido à diminuição da eritropoiese causada pela IRC e/ou

infecção crónica e pode ser agravada pela perda de sangue ou pela destruição imunológica de glóbulos vermelhos (Baneth et al., 2008).

1.9 - Alterações de hemograma, análises bioquímicas e urianálise

As alterações laboratoriais mais comuns a nível do hemograma são a anemia não-regenerativa, trombocitopenia, leucocitose ligeira ou leucopenia associada a linfopenia, eosinopenia e monocitopenia. Ao nível das bioquímicas podemos encontrar azotemia, hiperfosfatemia, hipermagnesiemia, Fosfatase Alcalina Sérica (FAS) e Alanina Aminotransferase (ALT) aumentadas e hipercolesterolemia (Solano-Gallego et al., 2009; Petersen, 2010; Baneth & Solano-Gallego, 2012; Veras et al., 2014). A hiperproteinemia é outra alteração bioquímica frequente. Esta é atribuída à hiperglobulinemia policlonal β e γ e está quase sempre associada a uma hipoalbuminemia, que por sua vez é causada pela perda de proteína por nefropatia, doença hepática e mal nutrição. A hiperglobulinemia pode por vezes compensar a hipoalbuminemia, resultando em valores normais de proteínas séricas (Koutinas et al., 1999). Na urianálise é comum encontrar-se proteinúria, por nefropatias com perda de proteína, como glomerulonefrite com deposição de imunocomplexos. (Solano-Gallego et al., 2009; Petersen, 2010).

1.10 - Diagnóstico

O diagnóstico é realizado para confirmar se um animal com sinais clínicos e alterações clínico-patológicas compatíveis com LCan, tem de facto a doença, bem como investigar a presença de infeção em estudos epidemiológicos, rastrear animais clinicamente saudáveis que vivem em regiões endémicas (geralmente solicitado pelos proprietários), evitar a transmissão de portadores subclínicos por transfusão de sangue e monitorizar a resposta ao tratamento (Miro et al., 2008).

Foram descritos diferentes métodos de diagnóstico específicos para a deteção de infeção por *L. infantum* em cães, incluindo cultura, histopatologia, citologia, imunohistoquímica, imunofluorescência direta e técnicas moleculares. A avaliação da resposta do hospedeiro é observada na serologia que dá informação sobre as IgG anti-*Leishmania* (Miró et al., 2008; Noli e Saridomichelakis, 2014). Cada método possui vantagens e desvantagens (Tabela 6) e a eleição de um determinado método depende da finalidade da pesquisa (Miró et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2011).

Tabela 7 – Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos diagnósticos na detecção de LCan em cães. (Adaptado de Solano-Gallego et al., 2011).

Técnicas de diagnóstico	Vantagens	Desvantagens
Serologia	<ul style="list-style-type: none"> Determinação do nível de Ac que é essencial para o diagnóstico e para estabelecer prognóstico 	<ul style="list-style-type: none"> Não deteta a atual presença de <i>Leishmania</i> Reações cruzadas com trypanosomas
Qualitativa	<ul style="list-style-type: none"> Teste rápido 	<ul style="list-style-type: none"> Apenas resultados positivo e negativo Sensibilidade e performance variável com risco de falsos negativos Um resultado positivo tem que ser avaliado posteriormente por uma serologia quantitativa
Quantitativa (IFAT, ELISA)	<ul style="list-style-type: none"> Determina o nível de Ac Níveis altos de Ac na presença de sinais clínicos compatíveis e/ou anomalias clínico patológicas são conclusivas de leishmaniose clínica 	<ul style="list-style-type: none"> Performance e acuidade de cut-off depende do laboratório Diferenças entre laboratórios Níveis baixos de Ac vão necessitar mais trabalho
Citologia / Histopatologia	<ul style="list-style-type: none"> Permite detecção direta do parasita e o tipo de resultados patológicos: <ul style="list-style-type: none"> - Resultados patológicos suspeitos de infecção - Permite exclusão de outros diagnósticos - Rápido e não-invasivo (citologia) 	<ul style="list-style-type: none"> Baixa sensibilidade para detetar amastigotas de <i>Leishmania</i> em tecidos ou fluidos corporais Requer a execução de outros testes diagnósticos, tais como imunohistoquímica e/ou PCR quando os parasitas não são visíveis Não revela o status imunológico do cão Necessita de experiência
PCR	<ul style="list-style-type: none"> Permite a detecção de DNA leishmaniose Alta sensibilidade (kDNA) e especificidade Quantificação de carga parasitária (se for PCR em tempo real) 	<ul style="list-style-type: none"> Resultados falsos positivos devido a contaminação com DNA do parasita. Diferentes técnicas usadas por diferentes laboratórios Não revela <i>status</i> imunológico
Cultura de Parasita	<ul style="list-style-type: none"> Permite o isolamento de <i>Leishmanias</i> Facilita a identificação isoenzimática do parasita 	<ul style="list-style-type: none"> Técnica de diagnóstico elaborada e demorada Pode necessitar um mês para dar o resultado Executada apenas em pesquisas laboratoriais

1.10.1 - Diagnósticos diretos

1.10.2 - Avaliação citológica

A avaliação citológica permite a detecção microscópica de formas amastigotas de *Leishmania* em macrófagos de tecidos afetados, nomeadamente de medula óssea, linfonodos, pele ou sangue periférico (Paltrinieri et al., 2010; Alvar et al., 2004).

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) deve ser realizada em todos os casos com lesões cutâneas papulares ou nodulares e/ou aumento de linfonodos. As lesões cutâneas ulcerativas também devem ser usadas como amostra, fazendo a raspagem da lesão ou usando métodos menos invasivos, como esfregaços por impressão (Paltrinieri et al., 2010).

Na ausência de sinais clínicos que possam ser atribuídos ou que envolvam um órgão ou tecido específico, as amostras devem ser obtidas a partir de tecidos em que os parasitas são mais provavelmente detectados, como a medula óssea, linfonodos, baço e *buffy coat* de sangue periférico. O material da amostra para avaliação citológica pode ser armazenado e na situação

de achados negativos, pode ser enviado a laboratórios de referência para testes de diagnóstico molecular (por exemplo, teste de PCR para detecção de DNA de *Leishmania*) (Paltrinieri et al., 2010).

1.10.3 - Avaliação histológica

A análise histopatológica dos tecidos dos órgãos infetados (corados com hematoxilina e eosina - HE) é utilizada para detectar a presença de parasitas. Podem ser necessárias pesquisas longas para se conseguir observar amastigotas (Maia & Campino, 2008).

Os órgãos mais afetados e usados para análise histológica são o baço, fígado, medula óssea e linfonodo poplíteo. No entanto, esta avaliação apresenta uma baixa sensibilidade (Paltrinieri et al., 2010).

A imunohistoquímica pode ser realizada por meio de Ac contra antígenos de LCan. Contudo, este método pode ter resultados falsos-negativos, pois a sua sensibilidade depende da carga parasitária. Neste caso, podemos usar as porções de tecidos na realização de diagnósticos moleculares. (Paltrinieri et al., 2010; Maia & Campino, 2008).

1.10.4 - Cultura de *Leishmania*

A cultura de *Leishmania* é o ensaio mais específico devido ao desenvolvimento de formas promastigotas. O meio de cultura não está disponível comercialmente, sendo só possível a sua realização em laboratórios especializados (Paltrinieri et al., 2010).

Tem como desvantagem necessitar de um período longo (até 30 dias) antes que os resultados sejam obtidos e a colheita de material biológico ser um procedimento invasivo, sendo este teste apenas usado para efeitos de investigação (Paltrinieri et al., 2010 & Maia et al., 2008)

1.10.5 - Diagnóstico serológico

O diagnóstico serológico precoce é essencial para a confirmação da doença e direcionamento do tratamento inicial, para a seleção de animais clinicamente saudáveis que habitam ou são de regiões endêmicas, para a detecção de animais dadores de sangue com infecção subclínica e para a investigação da presença de LCan em estudos epidemiológicos (Proverbio et al., 2013).

A seroconversão pode ocorrer alguns meses após a infecção. O intervalo de seroconversão pode variar de 1 a 22 meses (média de 5 meses) após a infecção (Paltrinieri et al., 2010).

Os métodos sorológicos mais comuns na detecção de Ac anti-*leishmania* são o teste de imunofluorescência indireta (IFAT), ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e a imunocromatografia.

Quando a suspeita clínica de LCan persiste apesar de um resultado sorológico negativo, os testes devem ser repetidos com métodos mais sensíveis (Paltrinieri et al., 2010).

Existe ainda uma desvantagem das técnicas de diagnóstico serológico que é o aparecimento de casos falsos positivos. Isto deve-se a reações cruzadas em cães com doença de chagas (*Trypanosoma cruzi*), erliquiose e rickettsiose, mas também com outras espécies de *Leishmania*. (Gomes et al., 2008 & Solano-Gallego et al., 2009).

1.10.6 - IFAT

O IFAT é considerado o método padrão do diagnóstico sorológico. Esta técnica detecta Ac anti-*Leishmania* com especificidade de 100% para títulos de Ac iguais ou superiores a 1:160 (Proverbio et al., 2013).

Num estudo realizado, testando cães assintomáticos e sintomáticos de uma área endémica, a sensibilidade e especificidade foram de 85,5% e 94,7%, respectivamente (Maia et al., 2008).

Esta técnica é realizada através de uma série de diluições de soro em lâminas revestidas com formas promastigotas de *Leishmania*. Posteriormente, a presença de Ac é revelada através da utilização de anticorpos secundários anti-espécie conjugados com um fluorocromo (Paltrinieri et al., 2010). Na avaliação microscópica, as diluições em que revelam fluorescência, são positivas. Uma das limitações do teste é o facto da avaliação da intensidade da fluorescência através da microscopia recorrer a uma interpretação subjetiva dos resultados (Paltrinieri et al., 2010).

Elevados níveis de Ac estão relacionados com uma grande carga parasitária, o que permite um diagnóstico definitivo de LCan (Proverbio et al., 2013). No entanto, esses elevados títulos não estão associados com a gravidade dos sinais clínicos, sendo úteis apenas para diferenciar os casos subclínicos (baixo título de Ac), dos que apresentam a disseminação do parasita ou doença (elevado título de Ac) (Paltrinieri et al., 2010).

Este teste é utilizado em estudos epidemiológicos, prática clínica e monitorização do tratamento (Maia et al., 2008).

1.10.7 - Teste ELISA

O teste ELISA permite a deteção de Ac específicos, utilizando um antigénio (Ag) solúvel adsorvido a uma superfície de plástico, sobre o qual são colocados os soros suspeitos. A evidenciação dos complexos Ag/Ac é feita pela adição de um conjugado anti-espécie ligado a uma enzima, do substrato enzimático e de um cromogéneo, desencadeando uma reacção enzimática demonstrada pelo aparecimento de cor (Maia & Campino, 2008).

Esta técnica pode ser realizada através de soro. Os principais Ag usados são extratos solúveis de promastigotas e proteínas purificadas recombinantes (Miró et al., 2008). O extrato inteiro do parasita é sensível para a deteção de infeção subclínica ou clínica, mas apresenta uma especificidade relativamente baixa (Mettler et al., 2005; Ferreira et al., 2007). No entanto, com o uso de péptidos recombinantes, como as proteínas K9, K26 e K39, a técnica de ELISA é bastante específica (100%) e sensível (98%) na deteção de cães infetados clinicamente saudáveis (Mettler et al., 2005; INNO, 2012).

O teste comercial Leiscan® é um ensaio imunoenzimático útil para deteção de infeção em cães assintomáticos. Os resultados (razão da amostra) têm equivalência com um determinado título IFAT, de acordo com a Tabela 7.

Tabela 8 – Equivalência entre a razão da amostra (Rz) do teste comercial Leiscan e o título de IFAT
Adaptado de.

Razão (Rz) da amostra	Resultado	Correspondência IFAT
$Rz < 0,5$	Negativo	Negativo
$0,5 < Rz < 0,7$	Negativo	1/20 a 1/40
$0,7 < Rz < 0,9$	Negativo	1/40 a 1/80
$0,9 < Rz < 1,1$	Duvidoso	1/80
$1,1 < Rz < 1,5$	Positivo Baixo	1/80 a 1/160
$1,5 < Rz < 2$	Positivo Alto	1/160 a 1/320
$2 < Rz < 3$	Positivo Alto	1/320 a 1/640
$3 < Rz < 4$	Positivo Muito Alto	1/640 a 1/1280
$Rz > 4$	Positivo Muito Alto	$> 1/1280$

1.10.8 - Imunocromatografia - testes rápidos

Os kits rápidos de testes imunocromatográficos são muito úteis, uma vez que o seu formato de teste único e a sua facilidade de resposta rápida, permite a ação imediata do médico veterinário. No entanto, os seus resultados podem ser questionáveis (Maia et al., 2008).

Existem vários kits comerciais, sendo que cada um utiliza um Ag e um reagente diferente (Paltrinieri et al., 2010). O aparecimento de duas linhas, uma de controlo e outra de teste, significa um resultado positivo (Maia et al., 2008). Normalmente, apresenta uma boa sensibilidade e especificidade, mas a sensibilidade pode ser variável (Solano-Gallego et al., 2009). No entanto, apresenta uma sensibilidade mais baixa em relação ao IFAT e ELISA, que ronda os 30-70% (Paltrinieri et al., 2010).

1.10.9 - Diagnóstico molecular

A técnica de PCR permite amplificar quantidades muito pequenas do DNA do parasita, é relativamente rápida e pode ser aplicada a qualquer tipo de amostra biológica (medula óssea, linfonodos, biópsias diversas, amostras conjuntivais, sangue) (Ferreira, Ituassu, de Melo & de Andrade, 2008; Manna et al., 2008).

O método de PCR demonstra ser capaz de ultrapassar problemas como a baixa sensibilidade encontrada nos métodos parasitológicos e outros, como o valor preditivo limitado da serologia, por interferência de Ac persistentes ou pela presença de imunossupressão. No entanto, os protocolos do PCR convencional (cPCR), não permitem uma análise quantitativa da carga parasitária (Manna et al., 2008).

A técnica de PCR é muito útil em casos duvidosos e para a deteção da persistência da infeção em cães tratados que atingiram a cura clínica. No entanto, em cães portadores ou com baixa carga parasitária pós-tratamento, as técnicas qualitativas ou semiquantitativas têm pouco valor diagnóstico, porque apenas indicam se os animais são ou não positivos (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A informação fornecida pelo PCR deve ser avaliada juntamente com a informação clínica do animal e, se necessário, testes serológicos (Solano-Gallego et al., 2009).

Os mais usados são a cPCR, PCR “nested” e PCR em tempo real (rtPCR), que pode proporcionar análise quantitativa (Paltrinieri et al., 2010). No cPCR, o DNA de *Leishmania* é amplificado usando “primers” específicos (pequenas sequências complementares às sequências de DNA de *Leishmania*). Na PCR “nested” são realizadas duas amplificações

consecutivas com “primers” internos (Paltrinieri et al., 2010). A PCR qualitativa pode ser útil quando é necessário ter um diagnóstico imediato e sensível, especialmente em casos com resultados serológicos duvidosos (Gomes et al., 2008). Na rtPCR são usadas sondas fluorescentes para quantificar o número de cópias de DNA de *Leishmania* presentes numa amostra biológica, a partir de uma quantidade padrão de DNA predefinida (Paltrinieri et al., 2010).

Os cães sintomáticos ou aqueles que progridem nesse sentido irão normalmente dar resultados positivos na serologia e na PCR. Porém, um único resultado de PCR negativo num cão clinicamente suspeito de leishmaniose não é suficiente para excluir a infecção. Quando a suspeita é elevada, é recomendada a avaliação de tecidos adicionais por PCR (Baneth e Aroch, 2008). Os cães doentes com análise de PCR negativa e que apresentem um baixo título de Ac anti-*Leishmania* devem ser considerados como cães que estiveram expostos ao parasita e que estarão afetados clinicamente por outra doença. Para a análise por PCR, as amostras podem ser frescas, congeladas ou então fixadas em álcool etílico a 95% (Paltrinieri et al., 2010). A abordagem diagnóstica em cães doentes que habitam em áreas endêmicas é demonstrada na figura 9.

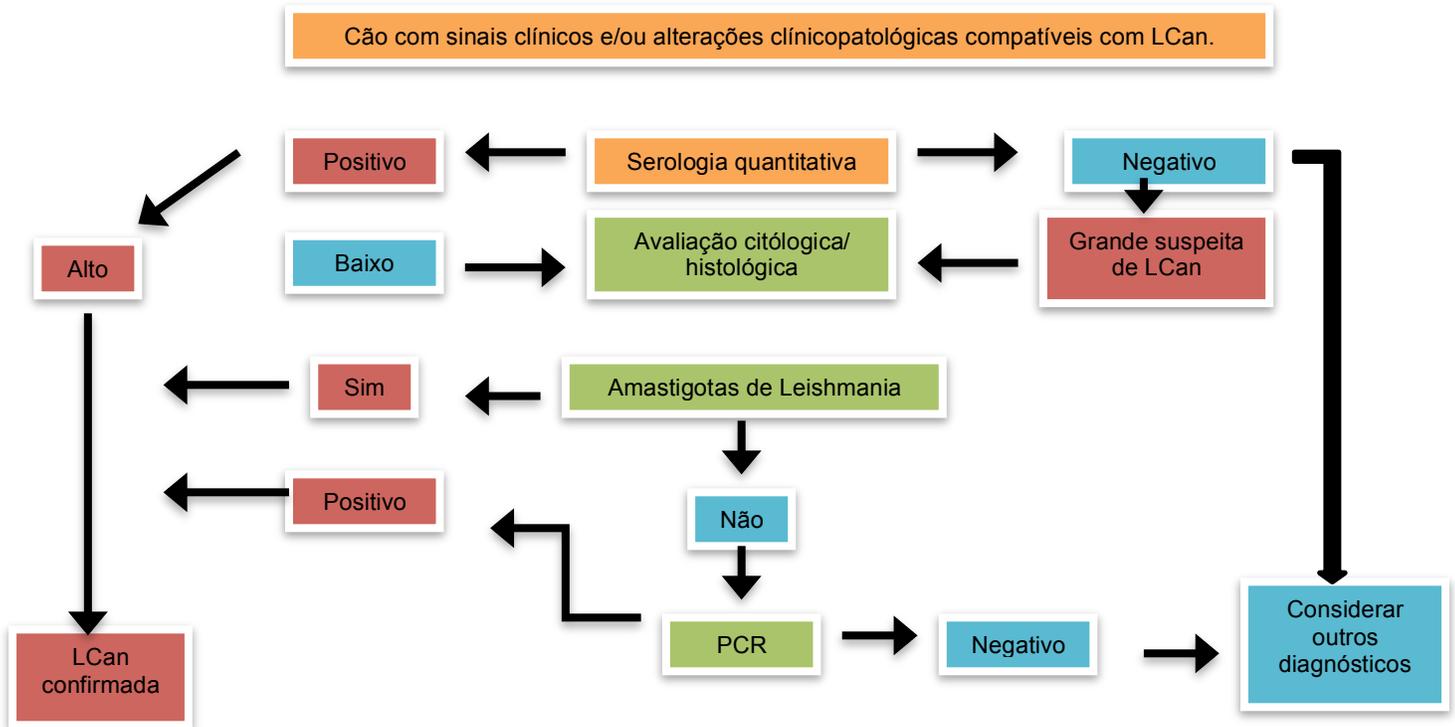


Figure 10- Fluxograma de abordagem diagnóstica em cães com suspeita de LCan (Adaptado de Solano-Gallego et al., 2011).

1.12 - Tratamento

O tratamento farmacológico da LCan é um desafio para os médicos veterinários. Devido à sua complexa patogênese, a LCan pode manifestar-se com diferentes sinais clínicos, variando de leves aqueles que refletem envolvimento grave de vários órgãos. A resposta imune desempenha um papel importante no desenvolvimento e resposta ao tratamento da infecção por *Leishmania* em cães. Todos os fármacos anti-*Leishmania* conhecidos, usados em cães, podem levar à remissão temporária ou permanente dos sinais clínicos, mas nenhum consegue eliminar a infecção. De facto, todos os fármacos anti-*Leishmania* atualmente utilizados em cães foram descobertos e desenvolvidos para tratar a leishmaniose humana. A maioria dos protocolos terapêuticos foram desenvolvidos através de estudos clínicos em humanos e, posteriormente, adaptados aos cães. Nos cães, os objetivos do tratamento anti-*Leishmania* são induzir uma redução geral da carga parasitária, tratar alterações dos órgãos causadas pelo parasita, restaurar respostas imunitárias eficientes, estabilizar uma melhoria clínica e evitar a recidiva clínica (Olivia et al.,2010).

A monitorização e acompanhamento dos parâmetros clínicos e laboratoriais dos cães tratados é importante para uma adequada gestão da doença (Baneth et al.,2008). A resposta ao tratamento pode variar de boa a má, dependendo do estado clínico inicial e do próprio animal. Os fármacos mais utilizados devem ser escolhidos de acordo com os diferentes estádios da doença (Olivia et al., 2010).

O grupo LeishVet propôs um sistema de quatro estádios, baseados nos sinais clínicos, e alterações clinicopatológicas e serológicas, sugerindo também vários protocolos terapêuticos e prognósticos para cada estágio clínico (Tabela 8) (Solano-Gallego et al., 2011).

Tabela 9 – Estadiamento de LCan baseado no estado serológico, sinais clínicos, achados laboratoriais e tipo de terapia e prognóstico para cada estágio (Adaptado de Solano-Gallego et al., 2009; Leishvet, 2017).

Estádios clínicos	Serologia *	Sinais clínicos	Resultados laboratoriais	Terapia	Prognóstico
Estádio I- Doença leve	Título de Ac negativo a positivo baixo	Cães com sinais clínicos leves, tais como, linfadenomegalia periférica ou dermatite papular	Normalmente não se observa alterações clínico patológicas. Perfil renal normal: creatinina < 1.4 mg/dl; sem proteinúria: UPC < 0,2	Alopurinol ou domperidona ou antimoniato de meglumina ou miltefosina/Alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol + miltefosina **	Bom
Estádio II- Doença Moderada	Título de Ac positivo baixo a alto	Cães que, além dos sinais clínicos referidos para o estágio I, podem apresentar: lesões cutâneas simétricas ou difusas, tais como, dermatite exfoliativa, onicogribose, úlceras (no plano nasal, nas almofadas plantares, junções mucocutâneas), anorexia, perda de peso, febre e epistaxis	Alterações clinicopatológicas como anemia não regenerativa leve, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome de hiperviscosidade do soro. Substádios: a) Perfil renal normal: creatinina < 1,4 mg/dl; sem proteinúria: UPC < 0,2 b) Creatinina < 1,4 mg/dl; UPC: = 0,2- 0,5	Alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol + miltefosina.	Bom a reservado
Estádio III- Doença severa	Título de Ac positivo médio a alto	Cães que, além dos sinais clínicos referidos para o estágio I e II, podem apresentar sinais originados por deposição de imunocomplexos: vasculites, artrites, uveíte e glomerulonefrite	Alterações clinicopatológicas referidas no estágio II IRC estágio I da IRIS com UPC > 0,5 ou estágio II da IRIS com creatinina 1,4-2mg/dl	Alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol + miltefosina. Seguir as recomendações da IRIS para IRC.	Reservado a mau
Estádio IV - Doença muito severa	Título de Ac positivo médio a alto	Cães com sinais clínicos referidos no estágio III. Tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótico e estágio final de doença renal	Alterações clinicopatológicas referidas no estágio II IRC estágio III da IRIS (creatinina 2,1-5 mg/dl) ou estágio IV (creatinina >5 mg/dl) Síndrome nefrótica: marcada proteinúria UPC >5	O tratamento específico deve ser administrado individualmente. Seguir as recomendações da IRIS para IRC.	Mau

Legenda- * Em cães com título de Ac negativo ou positivo médio, a infecção deve ser confirmada por outro método de diagnóstico parasitológico ou molecular. Níveis altos de Ac, definidos como uma elevação de três a quatro vezes o valor de cut off de um laboratório de referência, são conclusivos para o diagnóstico de LCan. ** Cães no estágio I provavelmente necessitarão de um tratamento menos prolongado com uma ou duas drogas combinadas ou alternativamente apenas monitorização sem realização de tratamento. No entanto, existe uma limitada informação sobre cães neste estágio e, portanto, as opções terapêuticas continuam por definir.

1.12.1 - Alopurinol

O alopurinol é um análogo da hipoxantina, que inibe a atividade da xantina oxidase, uma enzima que é responsável pela catalização das hipoxantinas e consequente produção de xantinas, que por sua vez dão origem ao ácido úrico (Oliva et al., 2010). Quando é incorporado

nas formas intracelulares de *Leishmania*, transforma-se num composto tóxico e inativa o parasita. É usado em monoterapia ou combinado com antimoniatos pentavalentes. Tem a vantagem de ser barato e de fácil administração para os proprietários, pois é uma formulação oral e relativamente atóxico (Baneth e Shaw, 2002; Oliva et al., 2010).

O uso de alopurinol causa hipoxantúria, a qual pode ocasionalmente originar urolitíase (Plevraki et al., 2006).

Quando utilizado em monoterapia, o alopurinol resulta numa remissão dos sinais clínicos e restabelecimento das alterações clinicopatológicas, associado a uma diminuição da carga parasitária (Saridomichelakis et al., 2005).

A tolerabilidade do fármaco é excelente e parece diminuir a deterioração da função renal em cães com proteinúria, mas sem insuficiência renal. O mais comum é o uso de alopurinol por períodos de vários meses. As doses recomendadas de alopurinol para administração oral (PO) é de 10 mg/kg, duas vezes ao dia (BID) (Solano-Gallego et al., 2009).

1.12.2 - Combinação de antimoniato de meglumina com alopurinol

O antimoniato de meglumina (Glucantime®) pertence ao grupo dos antimoniatos pentavalentes. Estes inibem a glicólise e a peroxidação lipídica do parasita (Baneth e Shaw, 2002; Oliva et al., 2010).

A combinação de antimoniato de meglumina e alopurinol é o tratamento mais comumente utilizado na LCan, embora não resulte numa cura parasitológica completa. Os cães tratados com esta combinação têm um período mais longo de remissão clínica do que quando tratados com qualquer dos fármacos sozinhos. O protocolo mais frequente consiste em administrar por via subcutânea (SC) antimoniato de meglumina na dose de 75 a 100 mg/kg, uma vez por dia (SID), durante 4 semanas, em combinação com alopurinol administrado PO, na dose de 10 mg/kg, BID, durante vários meses (Solano-Gallego et al., 2009; Oliva et al., 2010). Os efeitos adversos associados descritos são dor no local da injeção, abscesso/celulite cutânea, vômito, diarreia, uveíte e potencial nefrotoxicidade (Miró et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

1.12.3 - Combinação de miltefosina com alopurinol

A miltefosina é uma alquilfosfocolina que foi desenvolvida como agente antineoplásico e, mais tarde, usado para tratar a leishmaniose em humanos. Tem um efeito tóxico direto na *Leishmania*, contudo, também aumenta a ativação das células T e dos macrófagos e a produção de NO (Oliva et al., 2010; Reguera et al., 2016).

A miltefosina pode ser usada em monoterapia ou combinada com fármacos leishmanióstáticos, como o alopurinol (Reguera et al., 2016).

A dose atualmente recomendada de miltefosina em monoterapia para o tratamento LCan é de 2,0 mg/kg/dia, PO, durante um total de 30 dias (Reguera et al., 2016).

Após o tratamento, a carga parasitária é reduzida de forma eficiente na maioria dos órgãos infetados. Porém, a eliminação completa dos parasitas da medula óssea não é atingida, o que implica que os cães clinicamente curados permanecem parasitologicamente positivos (Reguera et al., 2016; Manna et al., 2015). A miltefosina não tem efeitos nefrotóxicos, embora a presença de outros efeitos tóxicos não possa ser excluída. Em geral, a falta de nefrotoxicidade torna a miltefosina mais segura em relação ao antimoniato de meglumina em cães com IRC, pois é menos provável a ocorrência de dano renal grave (Reguera et al., 2016; Bianciardi et al., 2009). No entanto, durante o tratamento com este fármaco, foram observados vários efeitos secundários ligeiros em cães, tais como, vômitos e diarreia (Oliva et al., 2010; Reguera et al., 2016).

1.12.4 - Anfotericina B

A anfotericina B tem atividade fungicida e leishmanicida, devido à sua interação com um complexo de 24 esteróis, principalmente o ergosterol e o episterol, abundantes na membrana plasmática dos fungos e da *Leishmania* (Oliva et al., 2010). Embora altamente eficaz, a anfotericina B é tóxica e está associada a efeitos adversos graves, que incluem o comprometimento da função renal, piréxia, vômitos e anorexia. Uma dose diária de 0,5 mg/kg, intravenosa (IV), em dias alternados, durante 4 semanas, resulta numa cura parasitológica em 97% dos seres humanos com leishmaniose. Em cães, a anfotericina B diluída em solução salina estéril (NaCl a 0,9%) foi administrada IV. Embora a formulação permita a cura clínica da maioria dos cães tratados, geralmente não é usada como tratamento de rotina por causa de complexidade na preparação e administração. Quando administrada em cães, a mesma

formulação lipossomal resulta numa cura clínica rápida, embora a melhoria seja invariavelmente seguida de recaídas (Olivia et al., 2010).

1.12.5 - Domperidona (LeishGuard®)

A domperidona é um antagonista dos recetores dopamina D2 com ação procinética gástrica e antiemética. O efeito antidopaminérgico provoca a libertação de serotonina que, por sua vez, estimula a produção de prolactina. A prolactina, para além de estimular a produção de leite, tem também um papel importante na resposta imunitária celular do tipo Th1, conduzindo à libertação de IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α , bem como à ativação de macrófagos. (Oliva et al., 2010; Noli e Saridomichelakis, 2014).

A domperidona é administrada PO para prevenir LCan em doses de 0,5 mg/kg, SID, durante pelo menos 4 semanas. Como medicação preventiva, deve-se realizar o tratamento duas vezes por ano (nos meses de junho e outubro). De acordo com um recente ensaio clínico preventivo, a administração de domperidona durante 30 dias consecutivos, a cada 4 meses, reduz significativamente o risco de desenvolvimento de LCan. Estes resultados mostram que o tratamento induz a ativação de fagócitos que persiste pelo menos até um mês após o final da administração do fármaco, reduzindo o risco de infeção. Especulou-se que este tratamento profilático conferiu proteção mais efetiva do que algumas vacinas em áreas endémicas com alta prevalência de LCan (Gómez-Ochoa et al., 2009; Reguera et al., 2016).

Como tratamento curativo nos estádios iniciais da infeção, o tratamento pode ser repetido, conforme necessário, de acordo com a remissão de sinais clínicos (Gómez-Ochoa et al., 2012). A administração oral deste fármaco em cães infetados produz uma melhoria nos sinais clínicos associados à LCan e diminuição significativa do título de Ac, apesar de não se conseguir uma remissão completa da doença. A domperidona poderá também ser integrada como fármaco imunomodulador em protocolos de eficácia provada tal como o antimoníato de meglumina/alopurinol (Gómez-Ochoa et al., 2009).

Não foram referidos efeitos nefrotóxicos após o tratamento com domperidina e raramente foram descritos, apatia e distúrbios digestivos (dor abdominal, diarreia e perda de apetite), que desaparecem quando o tratamento é descontinuado. Em raras ocasiões, foram observadas alterações nas glândulas mamárias (hiperplasia mamária e aumento da produção de leite) devido ao efeito galactogogo da prolactina (Reguera et al., 2016).

1.12.6 – Outros fármacos

Existem outros fármacos que podem também ser utilizados no tratamento da LCan, tais como a pentamidina, espiamicina, metronidazol, marbofloxacina e enrofloxacina.

A pentamidina é uma diamidina aromática que tem sido utilizada como segunda linha de tratamento para humanos com leishmaniose. A atividade leishmanicida do fármaco pode ser mediada pela sua influência na biossíntese das poliaminas e no potencial da membrana mitocondrial. A sua administração resulta em efeitos secundários graves, tais como vômitos, diarreia, hipersalivação, hipotensão sistêmica e choque anafilático (Olivia et al., 2010).

A combinação de metronidazol e espiamicina (Stomorgyl®) é frequentemente usada em medicina veterinária para tratamento de diversas infeções. Devido à atividade anti-*Leishmania* do metonidazol *in vitro*, foi realizado um estudo onde foi comparada a eficácia da combinação de espiamicina (150.000 U/kg, PO, SID) e metronidazol (25 mg/kg, PO, SID) em 13 cães com leishmaniose, e um grupo controlo de 14 cães tratados com antimoniato de meglumina e alopurinol, com doses de 55-100 mg/kg, SC, BID e 20 mg/kg, PO, BID, respetivamente. Todos os cães foram tratados durante 90 dias, verificando-se no grupo controlo uma melhoria clínica após 30 dias, enquanto que no grupo testado demorou em média 45 dias. Em nenhum dos grupos se registou cura parasitológica. Segundo os autores, esta combinação pode ser considerada como um tratamento de segunda linha, no caso de cães que não respondam ao tratamento ou que apresentem intolerância aos fármacos mais usados (Pennisi et al., 2005).

A marbofloxacina é uma fluorquinolona sintética desenvolvida para o uso em medicina veterinária. *In vitro*, este fármaco possui uma atividade leishmanicida direta e indireta pela produção de TNF- α e ON (Noli & Saridomichelakis, 2014). Foi realizado um ensaio clínico em cães infetados naturalmente, tratados com marbofloxacina numa dose de 2 mg/kg, PO, SID, durante 28 dias. Este esquema contribuiu efetivamente para a remissão dos sinais clínicos, particularmente da linfadenomegalia, onicogribose e esplenomegalia, em três meses, em cerca de 70% dos casos. Mesmo assim, é provável que ocorram recaídas em mais de 50% dos casos. Após um ano de acompanhamento dos cães tratados com marbofloxacina, encontrou-se uma taxa de remissão da sintomatologia similar, mas os cães permaneceram parasitologicamente positivos na análise de amostras de linfonodos por PCR (Reguera, 2016).

A enrofloxacina tem a capacidade de aumentar a atividade dos macrófagos contra a *Leishmania* spp *in vitro* através da produção de NO. A atividade anti-*Leishmania* da

enrofloxacina, sozinha ou em combinação com metronidazol, foi avaliada em cães, sendo que todos apresentaram uma recuperação de curta duração e melhoria parcial dos sinais clínicos (Olivia et al., 2010).

1.13 - Monitorização

A monitorização é a avaliação contínua do doente, ao longo de uma doença. No contexto da LCan, a monitorização envolve a avaliação da resposta ao tratamento de animais afetados (Roura et al., 2013).

Do ponto de vista clínico, o objetivo de monitorizar cães submetidos a tratamento é estabelecer se e quando os sinais clínicos diminuem e quando os parâmetros hematológicos e urológicos voltam ao normal (Roura et al., 2013).

Alguns cães têm uma diminuição da titulação de Ac associada a uma melhoria clínica. No entanto, há animais em que o título permanece aumentado, apesar de terem melhoria clínica. Nos animais em que ocorre um aumento da titulação, este deve ser considerado como uma recorrência (Solano-Gallego et al., 2009, 2011).

Os animais devem ser monitorizados durante e após o tratamento através da realização de exame físico e exames complementares, como o hemograma completo, bioquímicas séricas e urianálise com rácio UPC. Os animais devem ser controlados após o primeiro mês de tratamento e depois todos os 3 a 4 meses durante o primeiro ano. Mais tarde, se o animal recuperar clinicamente com o tratamento, devem ser feitas monitorizações a cada 6 a 12 meses. A monitorização serológica deve ser feita 6 meses após o tratamento inicial e, a partir daí, a cada 6 a 12 meses (LeishVet, 2017).

1.14 - Controlo e prevenção

Os vetores da leishmaniose podem ser controlados por meios genéticos ou biológicos, mas atualmente existem poucos métodos efetivos além dos controlos químicos. Tais medidas de controlo ajudam a reduzir as populações de flebótomos (Maroli et al., 2010).

Uma prevenção efetiva das picadas dos flebótomos pode ser alcançada através dos seguintes passos, tomados em conjunto: manter os cães dentro de espaços fechados durante a época de atividade do vetor (desde o anoitecer ao amanhecer), diminuir os microhabitats que são

favoráveis ao vetor na proximidade das casas ou em locais onde o cão passa a maior parte do tempo (por exemplo, o uso de inseticidas ambientais) e aplicar nos cães inseticidas tópicos que tenham atividade contra os flebótomos (Solano-Gallego et al., 2011).

Um importante método de controlo da leishmaniose é a pulverização residual de habitações- (*Indoor Residual Spraying* - IRS), que consiste na aplicação de inseticidas de ação prolongada nas paredes e telhados de casas e abrigos para animais domésticos. Os inseticidas mais utilizados para o controlo destes vetores são os organofosforados (clorpirifos-metilo), carbamatos (propoxur) e piretróides (cipermetrina, deltametrina, cialotrina) (Maroli et al., 2010).

Como os cães são os principais hospedeiros reservatórios de *L. infantum*, grande parte do controlo de vetores é neles colocado (Maroli et al., 2010). Os métodos comerciais mais usados são coleiras, *spot on* e *sprays*.

As coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (Scalibor®) resultam num grande efeito contra o *P. perniciosus* e mata até 60% dos insetos em 2 horas após a exposição. O uso destas coleiras previne em cerca de 80% as picadas dos flebótomo (Maroli et al., 2010). Segundo um estudo realizado por Otranto et al. em 2013, o uso de uma coleira impregnada com uma combinação de imidacloprid a 10% e flumetrina a 4,5% (Seresto®) conferiu protecção a longo prazo contra pulgas, ixodídeos e flebótomos, em cães e gatos, sendo segura e eficaz (93,4%) durante 8 meses na prevenção da infeção por *L. infantum*.

Devido à libertação lenta do inseticida da coleira, a atividade é atingida uma a duas semanas após a sua aplicação (Maroli et al., 2010; Molina et al., 2012).

As formulações *spot-on* são eficazes nas primeiras 24 a 48 horas após a sua aplicação, pois é necessário que o princípio ativo se espalhe por toda a superfície corporal (Maroli et al., 2010). Uma combinação de 10% de imidaclopride e 50% de permetrina (Advantix®) foi desenvolvida numa formulação tópica dérmica como agente profilático contra carraças, pulgas, mosquitos e flebótomos. A atividade inseticida desta formulação *spot-on* contra picadas de *P. papatasi*, *P. perniciosus* e *Lutzomyia longipalpis* foi determinada experimentalmente, obtendo uma eficácia de 92,7% a 97,7% e proteção durante 3 semanas (Maroli et al., 2010).

Outras formulações *spot-on*, com uma solução de 65% de permetrina (Exspot®), são efetivas contra picadas de *P. perniciosus* e *Lutzomyia migonei* por 4 e 8 semanas (Maroli et al., 2010).

Os *sprays* tem uma ação inseticida imediata após a sua aplicação. Num estudo em ambiente laboratorial, a aplicação de *spray* de permetrina combinada com piriproxifen (regulador de

crescimento de insetos) produziu uma protecção de 87% a 94%, por um período de 3 a 4 semanas (Maroli et al., 2010).

1.15 - Imunoprofilaxia

A primeira vacina registada na Europa contra a LCan tem o nome comercial de CaniLeish® e é composta por proteínas do compartimento secretor-excretor de *L. infantum* (LIESP) e extrato purificado de *Quillaja saponaria* (QA-21), como adjuvante. Esta vacina estimula uma resposta imunomediada pelos linfócitos Th1, com base na produção de IFN- α . Além de promover um aumento nos níveis humorais de IgG2, induz uma forte mudança na resposta imune Th1 em cães (Moreno et al., 2014).

O protocolo vacinal passa pela administração de três doses SC, a cada 21 dias, revacinando-se, posteriormente, uma vez por ano (Moreno et al., 2014). Tem uma eficácia de 68,4% na prevenção do desenvolvimento de sinais clínicos (Oliva et al., 2014). Todos os cães devem ser testados serologicamente antes da administração da primeira dose da vacina. No caso do título de Ac ser negativo, a vacinação pode ser realizada. A CaniLeish® pode ser administrada a partir dos 6 meses de idade (Virbac, 2011). Os efeitos secundários podem ocorrer, geralmente, 3 dias após a administração da segunda e terceira doses. Os sinais mais comuns são dor local, prurido, inchaço, nódulos e febre, e resolvem-se espontaneamente em 2 a 8 dias (Oliva et al., 2014).

Recentemente, foi lançada uma nova vacina, a LetiFend®, que tem como princípio ativo a proteína Q. Esta proteína foi obtida através de recombinação genética de cinco fragmentos de quatro proteínas altamente antigénicas de *L. infantum*. O protocolo de administração consiste numa única dose anual, que confere uma protecção contra o desenvolvimento da doença desde o 28º dia após a vacinação e tem uma eficácia de prevenção de 72%. O único efeito secundário demonstrado até à data foi prurido no local da administração (Leti, 2016).

III. Trabalho experimental

1. Objetivos

O objetivo deste estudo foi caracterizar canídeos com LCan provenientes da região de Torres Vedras, em relação ao sexo, idade, raça, estilo de vida e profilaxia, com os dados clínicos do HVMSI, recolhidos durante o tempo de estágio. Foram também recolhidas informações acerca dos sinais clínicos, alterações laboratoriais, métodos de diagnóstico, quantificação da razão da amostra no teste Leiscan no momento do diagnóstico e do controlo, tipo de tratamento implementado e mortalidade dos animais afetados.

1.1 - Materiais e métodos

A amostra de animais em estudo foi constituída por 20 cães com LCan observados no HVMSI, durante um período de 6 meses (1 de Setembro a 1 de Março de 2016).

As amostras de sangue, para diagnóstico serológico e análises sanguíneas, foram obtidas aquando da observação dos animais em consulta e, posteriormente, passado 3 e 6 meses, nos pacientes que sobreviveram. O diagnóstico serológico foi realizado num laboratório externo, que utilizou o método ELISA Leiscan, enquanto que as análises sanguíneas foram realizadas no laboratório do HVMSI.

1.2 – Resultados

O estudo foi feito com 20 animais provenientes do concelho de Torres Vedras.

Dos 20 animais incluídos verificou-se que a maioria era do sexo masculino (60%) (Gráfico 2).

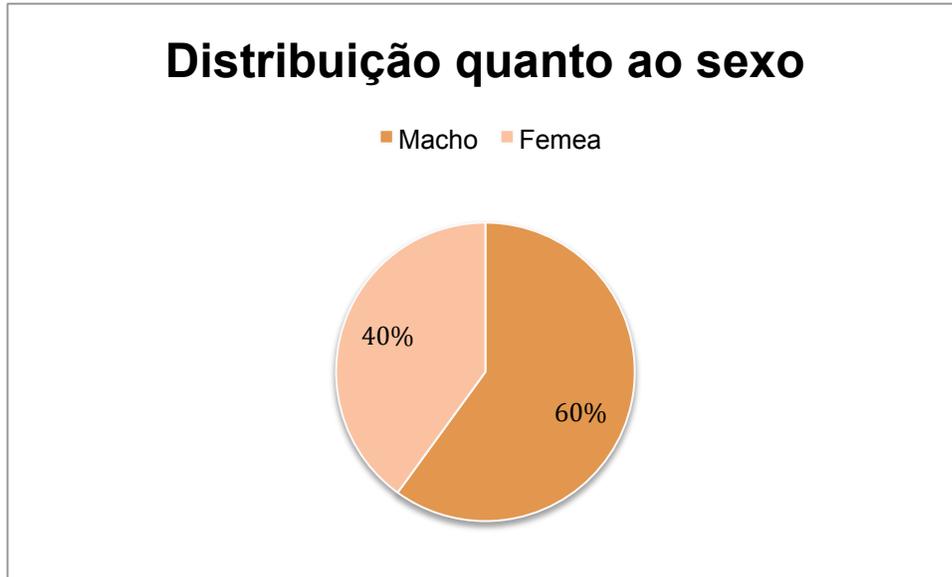


Gráfico 2 - Distribuição da população quanto ao sexo.

Na altura do diagnóstico a idade variou entre os 2 e os 10 anos, sendo a média de idades os 6 \pm 2,3 anos (Gráfico 3).

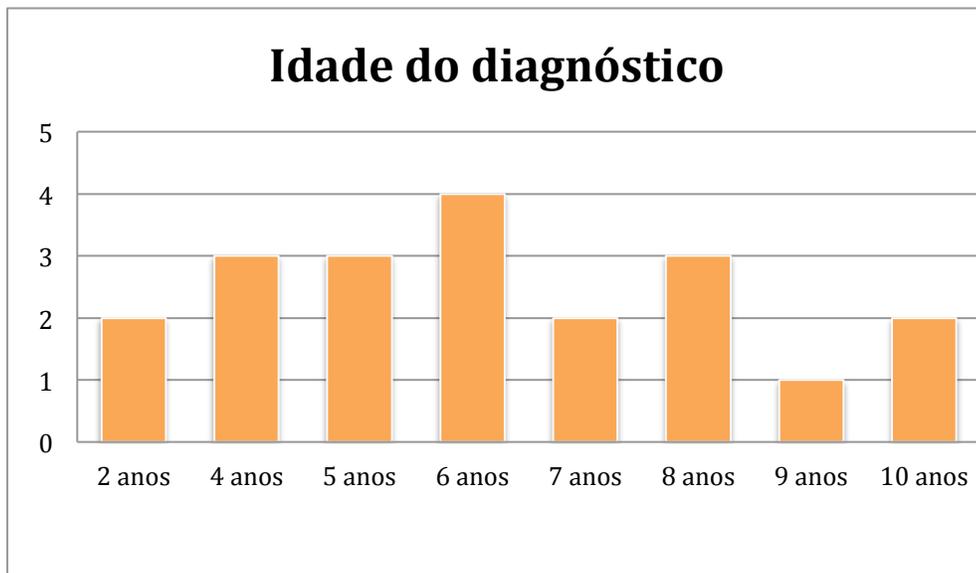


Gráfico 3 - Distribuição da população quanto à idade.

Quanto à raça, os animais sem raça definida (SRD) e Labrador Retriever encontraram-se em maior número (4/20, ou seja, 20%), seguindo-se o Braco Alemão, Bulldog Francês e Leão da Rodésia, as raças mais representadas na zona (2/20, ou seja 10%), como observado no gráfico 4.

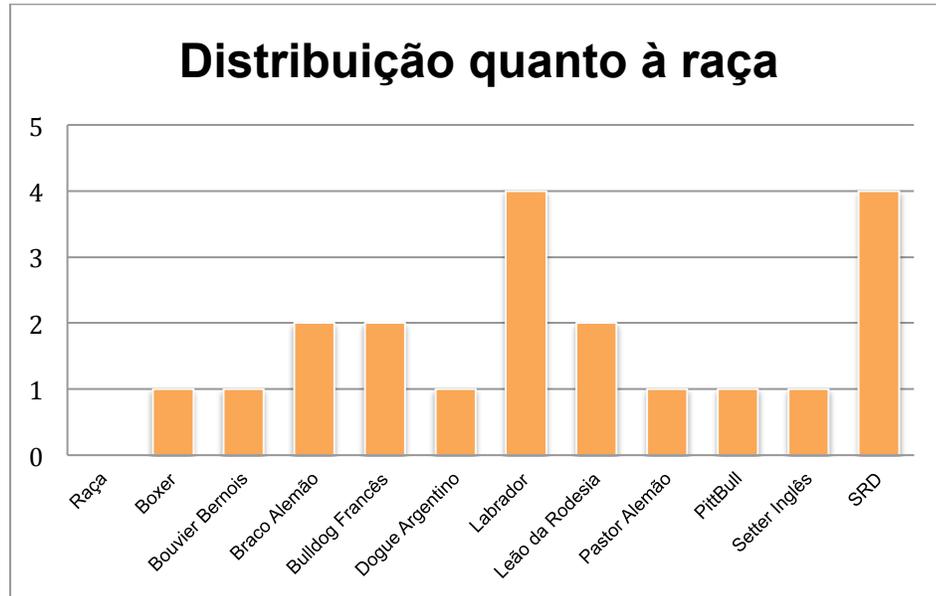


Gráfico 4 - Distribuição da população quanto à raça.

Dos animais diagnosticados com LCan, a maioria passava o dia no exterior, ficando resguardados no interior a partir do fim do dia (11/20 ou seja 55%), 35% (7/20) passava o tempo exclusivamente no exterior e 10% (2/20) estava predominantemente no interior (Gráfico 5).



Gráfico 5 - Distribuição da população quanto ao estilo de vida.

Quanto à prevenção adotada 100% dos animais utilizou desparasitante externo (Gráfico 6), a maioria usava formulações *spot-on*, nomeadamente pipetas da marca Advantix® (Imidaclopride + permetrina) e Vectra 3D® (Dinotefuran + piriproxifeno + permetrina) (40%), seguindo-se da conjugação da coleira da marca Scalibor® (deltametrina) com pipeta (35%), sendo o uso exclusivo de Scalibor® o menos utilizado (25%).

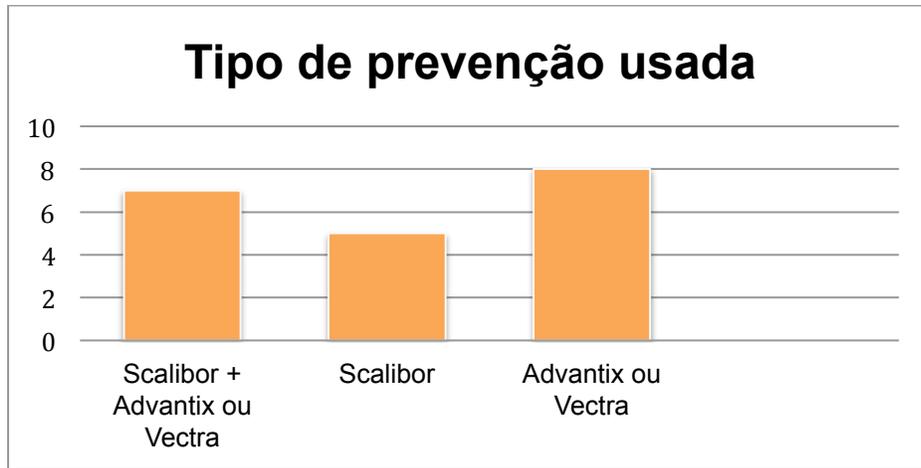


Gráfico 6 - Distribuição da população quanto ao tipo de prevenção usada.

Considerando a vacina como uma profilaxia contra LCan, pudemos verificar quantos animais fizeram a prevenção com Canileish®. Dos animais em estudo, 35% foram vacinados com esta vacina, ficando a maioria dos animais por vacinar (65%).

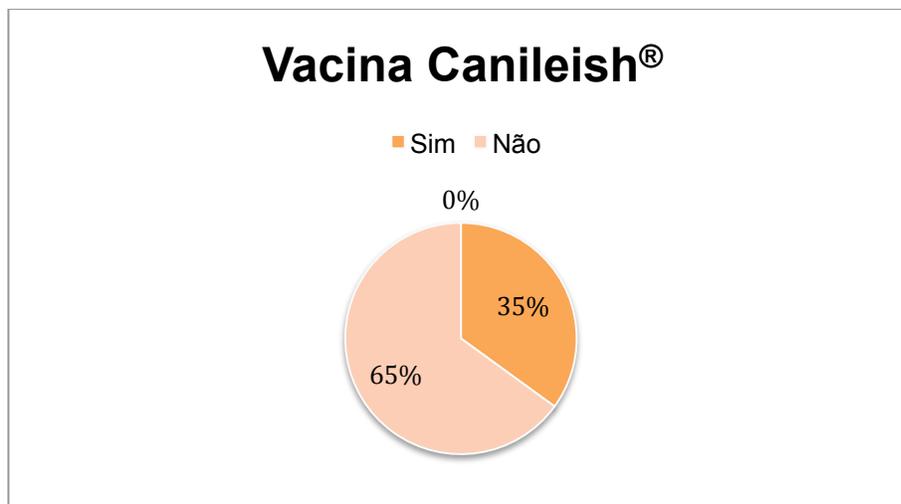


Gráfico 7 – Animais da população em estudo vacinados com CaniLeish®.

Nos animais observados, os sinais clínicos mais comuns foram os dermatológicos (75%), seguindo-se os gastrointestinais (55%) e a perda de peso (30%) e por fim, os sinais articulares (25%) e epistaxis (15%), como podemos observar no Gráfico 8.

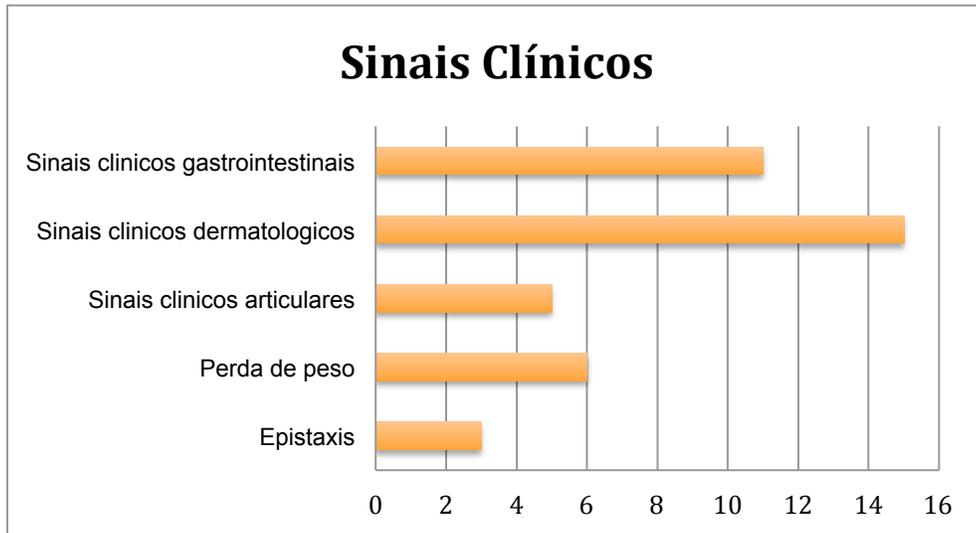


Gráfico 8 - Sinais clínicos apresentados pela população em estudo.

Nos animais estudados foram feitos hemograma e análises bioquímicas renais e hepáticas. As alterações laboratoriais predominantes foram a azotemia, anemia e a hipoalbuminémia, sendo estas detectadas em 7 dos 20 animais. A hiperproteinémia e o aumento das transaminases hepáticas foram observadas num menor número de animais, como podemos observar no gráfico 9.

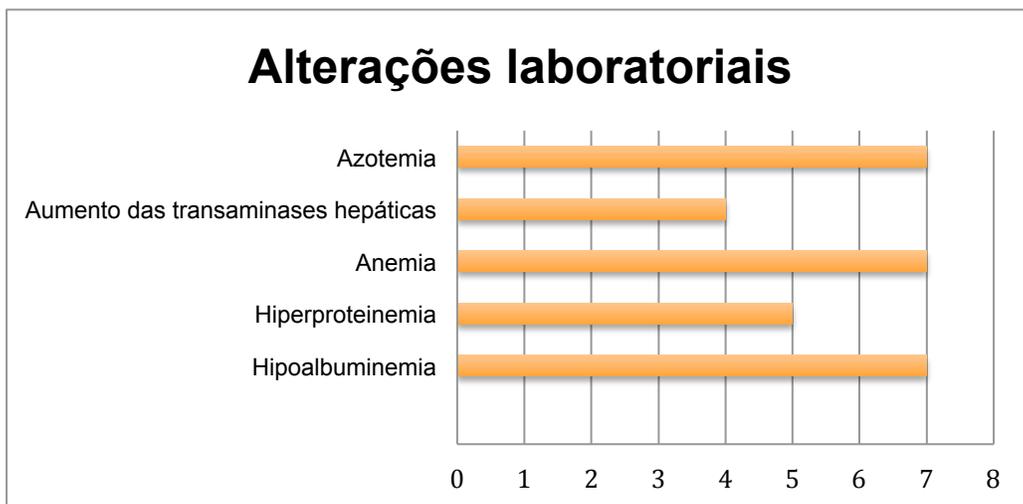


Gráfico 9 - Alterações laboratoriais apresentadas na população em estudo.

Podemos observar no gráfico 10 que a maioria dos animais foi diagnosticado por ELISA Leiscan (55%), sendo que 7 dos animais foram diagnosticados recorrendo ao teste Speed Leish K primeiro e, após resultado positivo, foi feita a serologia ELISA Leiscan (35%). O Speed Leish K como único método de diagnóstico foi usado em apenas 2 animais (10%).

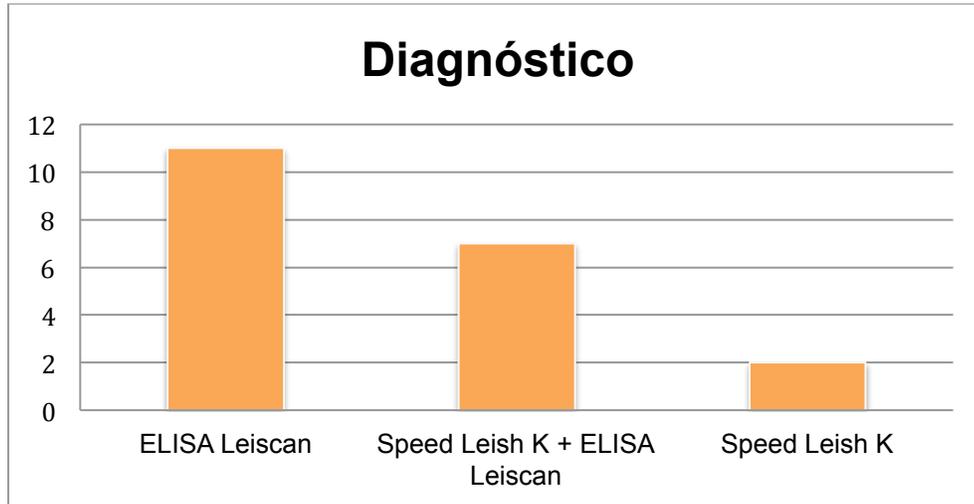


Gráfico 10 – Métodos realizados para o diagnóstico na população em estudo.

Dos 18 animais em que foi feita serologia ELISA, podemos observar no Gráfico 11 que o resultado da titulação predominante foi de positivo alto (> 1/320), tendo 1 animal apresentado um positivo baixo e 1 animal com uma titulação de positivo muito alto.

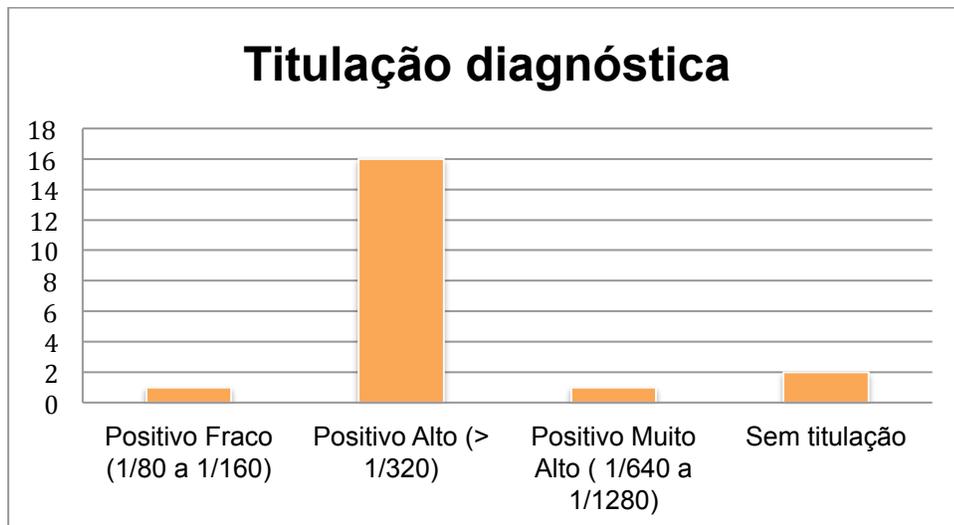


Gráfico 11 – Quantificação da titulação diagnóstica nos animais em estudo.

Segundo o Gráfico 12, podemos observar quais foram os tratamentos mais utilizados nestes animais, sendo a miltefosina em combinação com o alopurinol utilizado em mais de metade dos animais (55%). O tratamento exclusivo com alopurinol foi usado em 20% dos animais. A combinação de miltefosina com alopurinol com domperidona foi usada em 3 animais do estudo.

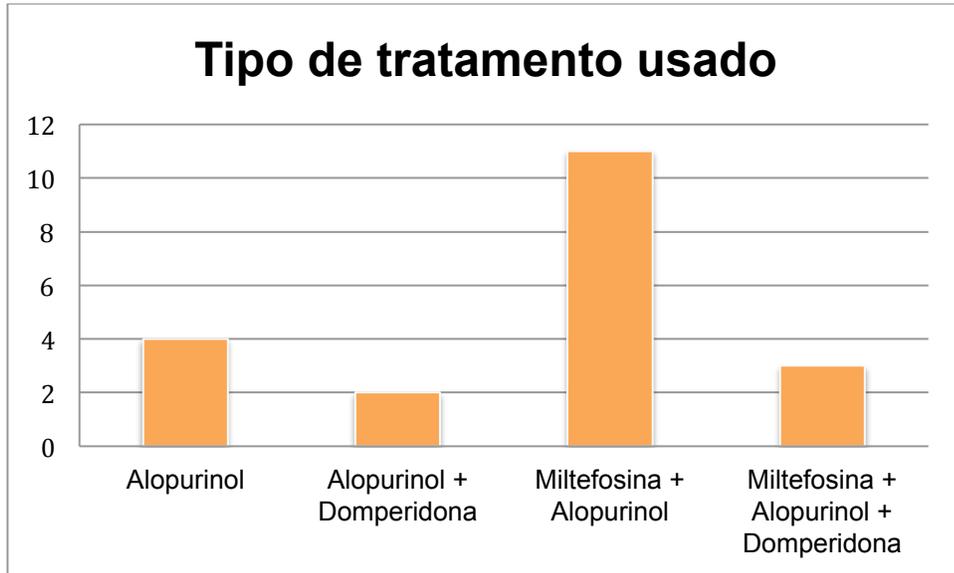


Gráfico 12 – Tipo de tratamento realizado aos animais afetados.

Após o tratamento foram feitas titulações de controlo em 10 dos 20 animais, sendo que metade manteve-se numa titulação de positivo alto e outra metade passou a um positivo baixo, como observado no Gráfico 13.

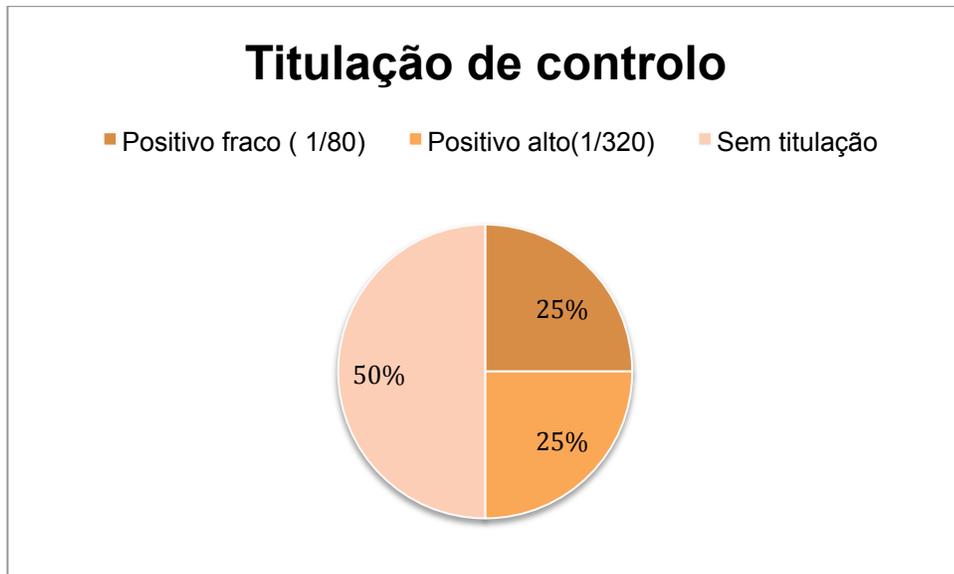


Gráfico 13 – Controlo analítico dos animais afetados no estudo.

No que diz respeito à taxa de mortalidade (30%) (Gráfico 14), 3 animais morreram por causas naturais, dias após o início da terapia com miltefosina em combinação com alopurinol, outros 3 foram eutanasiados, um deles por epistaxis descontrolada e IRC, outro por caquexia extrema, falta de apetite e IRC e o outro por IRC.

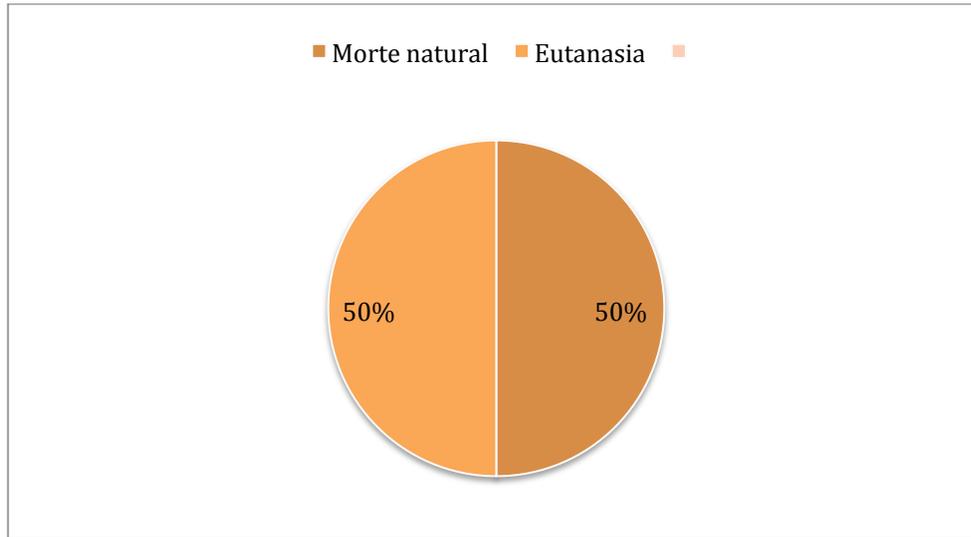


Gráfico 14 – Mortalidade existente nos animais afetados.

Dos 14 animais que se mantiveram vivos e em tratamento contínuo com alopurinol, uma cadela de raça Labrador Retriever teve uma recorrência, sendo necessária nova terapia com miltefosina em combinação com o alopurinol. Em 10 animais foram feitas novas titulações de controlo, sendo que 3 delas apresentaram uma titulação já negativa à LCan.

Os restantes 11 animais mantiveram-se controlados com terapia de alopurinol, mas nem todos têm vindo fazer os controlos periódicos de LCan.

Discussão

O distrito de Lisboa, onde se inclui o concelho de Torres Vedras, constitui uma zona de Portugal onde a LCan é considerada endémica, apontando a bibliografia para uma taxa de prevalência de 19,2% em 2003 (Onleish, 2017).

Segundo Ciaramella *et al* (1997) não existem diferenças relevantes no que diz respeito ao género dos animais afetados com LCan. Apesar de neste trabalho o número de machos (60%) afetados ter sido superior ao número de fêmeas (40%), a amostra em causa apresentava um número reduzido de indivíduos. Estes resultados encontram-se de acordo com os de Miranda *et al* (2008) em que (61%) dos animais eram machos e (39%) eram fêmeas.

No que diz respeito à idade, encontram-se referidas duas faixas etárias de prevalência da doença, antes dos 2 anos e após os 8 anos (Cardoso *et al*, 2004; Solano-Gallego *et al*, 2011). No presente estudo, no entanto, nenhum animal foi diagnosticado antes dos dois anos de idade, tendo o maior número de diagnóstico sido entre os 4 e os 8 anos (75%), sendo que apenas 3 dos animais do estudo (15%) foram diagnosticados após os 8 anos de idade.

No presente estudo, os cães SRD e os de raça Labrador Retriever encontraram-se mais frequentemente afetados (40%) pela doença em comparação com os animais de outras raças. Como referido na bibliografia, o Labrador é uma das raças mais suscetíveis, sendo uma representatividade de 20% neste estudo. Também os Boxers (5%) e os Pastores Alemães (5%), que também apresentam uma elevada susceptibilidade para contrair LCan, estiveram representados neste estudo (Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A maioria dos animais deste estudo possuía um estilo de vida predominantemente ou exclusivamente no exterior (90%), estando mais predispostos a serem infetados, uma vez que existe uma maior exposição ao vetor que pode estar infetado (Rosypal, 2005).

No que diz respeito ao tipo de prevenção utilizada, a maioria dos animais usava formulações *spot-on*, nomeadamente da marca Advantix® e Vectra 3D® (40%). Segundo Marolie *et al* (2010), a eficácia destas formulações situa-se entre os 92,7% e os 97%, fornecendo 3 semanas de proteção contra a picada do flebótomo. No caso da coleira Scalibor®, esta permite prevenir 80% das picadas durante 6 meses. No presente estudo não foi possível averiguar a real eficácia dos

diferentes métodos, uma vez que não foi possível determinar com precisão com os tutores qual a real frequência de aplicação das mesmas nos seus animais.

No que diz respeito à vacina CaniLeish[®] como método profilático contra LCan, segundo Oliva *et al* (2014), esta apresenta uma eficácia de 68,4% na prevenção e no desenvolvimento dos sinais clínicos. Após verificar os dados das fichas clínicas, conclui-se que o protocolo de vacinação recomendado foi concluído corretamente nos 13 animais do presente estudo vacinados. Uma vez que todos os animais do estudo, incluindo vacinados se encontravam paralelamente a fazer outros métodos de profilaxia contra LCan complementares à vacina, os mesmos podem ser infectados e ficar doentes, uma vez que não há nenhum método profiláticos que confira 100% de prevenção contra LCan.

No caso de existir um resultado falso negativo na pré-vacinação, uma vez que a sensibilidade dos testes rápidos é mais baixa que os IFAT e ELISA, isto poderia implicar a vacinação de animais infetados, aumentando assim o risco de desenvolvimento da doença (Solano-Gallego *et al*, 2014).

Nos animais presentes no estudo, os sinais clínicos predominantes corresponderam a alterações dermatológicas (75%) e gastrointestinais (55%), apresentando-se os sinais articulares (25%) e a epistaxis (15%) em menor número. Estas alterações dermatológicas já tinham sido descritas como as mais frequentes em pacientes com LCan, correspondendo a 81% dos sinais clínicos mais comumente apresentados (Baneth *et al*, 2008). Destas destacam-se as feridas de difícil cicatrização, como lacerações das almofadas plantares, onicogribose, hiperqueratose nasal e dermatite ulcerativa na extremidade das orelhas (Solano-Gallego *et al*, 2011). Relativamente aos sinais gastrointestinais, os vômitos apresentam-se como os mais relevantes, podendo ser justificados pela azotemia que afeta os cães infetados (Baneth *et al*, 2008).

De acordo com Baneth *et al* (2008), em animais sintomáticos, a epistaxis pode ter lugar em 10% dos casos. Também neste estudo, se encontrou uma percentagem semelhante dos animais (15%) que apresentou este sinal. A epistaxis poderia ser justificada devido à presença de trombocitopenia, trombocitopénia, hiperglobulinémia e vasculite (Baneth *et al*, 2008; Koutinas & Koutinas, 2014).

A perda de peso é também um sinal clínico frequentemente encontrado em cães com LCan (Solano-Gallego *et al*, 2011), tendo-se identificado, no presente estudo, 6 animais com esta sintomatologia (30%).

Dos animais do estudo, 25% apresentaram problemas articulares, também segundo Baneth *et al* (2008) estas alterações são bastante comuns (45%) e devem-se à presença do parasita, à circulação de imunocomplexos ou ao depósito de ambos na membrana sinovial.

Segundo Solano-Gallego *et al* (2011), a realização de hemograma, análises bioquímicas séricas, urianálise e rácio proteína:creatinina (UPC) é de extrema importância. No presente estudo, todos os animais foram submetidos à realização de hemograma e bioquímicas renais e hepáticas, não tendo sido feito, no entanto, urianálises e raios UPC a todos. No hemograma, a alteração mais comum correspondeu a anemia (35%), a qual pode ser atribuída à diminuição da eritropoiese causada pela IRC, agravada pela perda de sangue ou pela destruição de eritrócitos (Baneth *et al*, 2008). Tal como descrito por Solano-Gallego *et al* (2009), a leucocitose associada a linfopenia correspondeu paralelamente a uma das alterações mais frequentemente encontradas nos animais do presente estudo (30%). A hiperproteinémia apresentou-se ainda como uma alteração bioquímica relevante, tendo sido encontrada em 25% dos animais analisados. De acordo com Koutinas *et al* (1999), a hiperglobulinémia policlonal encontra-se na maioria das vezes associada a hipoalbuminémia, tendo esta última também sido encontrada em 35% dos animais deste estudo. Segundo os autores referidos, a hipoalbuminémia pode ter origem na perda de proteína por nefropatia e por doença hepática.

O aumento da creatinina e ureia teve lugar em 35% dos animais do presente estudo, resultados que se encontram de acordo com o descrito por Solano-Gallego *et al*, (2009). A LCan encontra-se associada a uma elevada prevalência de insuficiência renal crónica, a causa mais comum de morte associada à doença (Baneth *et al*, 2008).

Dos animais em estudo, 35% foram diagnosticados recorrendo a duas técnicas de diagnóstico. Em primeiro lugar foi realizado o teste Speed Leish K, tendo após a obtenção de um resultado positivo, sido realizada uma titulação de anticorpos pelo método ELISA, tal como descrito por Solano-Gallego *et al* (2011). De acordo com estes autores, um resultado positivo ou negativo num teste rápido deve ser sempre confirmado pelo método ELISA. Neste caso, e uma vez que apenas os resultados positivos foram confirmados por titulação, poderiam eventualmente existir

animais falsos negativos e infetados com a doença. Apesar de em 2 animais o resultado do teste Speed Leish K terem sido apresentados como positivos, a titulação de anticorpos não foi efetuada devido à não autorização dos seus tutores. Em 55% dos animais foi unicamente realizada, por opção dos donos, a titulação de anticorpos.

Ao analisar os resultados das titulações efetuadas aos 18 animais do estudo, pode verificar-se que 88,9% apresentava uma titulação positiva alta ($> 1/320$), 5,6% uma titulação positiva muito alta (1/640 a 1/1280) e outros 5,6% uma titulação positiva fraca (1/80 a 1/160). Uma titulação positiva muito alta em cães com sinais compatíveis é suficiente para diagnóstico de LCan, enquanto que num cão com titulação positiva baixa se recomenda uma maior atenção por parte do Médico Veterinário (Saridomichelakis, 2009). No presente estudo, o animal com titulação positiva baixa não foi submetido a mais testes, uma vez que os donos não apresentavam possibilidades financeiras para o efeito.

Segundo o grupo Leishvet, com a informação disponível relativamente ao historial clínico dos animais e dos resultados serológicos quantitativos obtidos, torna-se possível atribuir um estadio clínico da doença. Assim sendo, dos 18 animais em que se obteve titulações, 1 animal (5,6%) encontrava-se no estadio I, 9 (50%) no estadio II, 7 (38,9%) no estadio III e 1 (5,6%) no estadio IV.

No que diz respeito à terapia utilizada, mais de metade dos animais (55%) foi medicada com miltefosina e alopurinol. Em 6 dos animais (30%) não foi possível o uso de terapia leishmanicida por ser dispendiosa, optando os proprietários apenas por fazer o tratamento leishmanioestático com alopurinol por vários meses, como descrito por Solano-Gallego et al, (2009), sendo que 2 destes 6 animais foram feitas também terapia com domperidona. No que diz respeito aos efeitos secundários registados nos animais submetidos ao tratamento combinado com Miltefosina e Alopurinol, foi possível verificar que todos apresentaram vômitos e diarreia, resultados que se apresentam de acordo com os obtidos por Reguera *et al* (2009) e por Oliva *et al* (2010).

Segundo Solano-Gallego *et al* (2009), os animais com IRC devem seguir o tratamento recomendado pela IRIS, tornando-se importante a avaliação do rácio UPC, de modo a atribuir um estadio a cada animal (IRIS, 2016). No presente estudo, não foi realizada esta análise em nenhum animal, devido não só à rápida progressão da doença como, em alguns casos, às

fracas condições financeiras dos proprietários. Apesar de não ter sido realizada a classificação segundo a IRIS, foi realizado tratamento de suporte a todos os animais.

Tal como recomendado pelo grupo Leishvet, a monitorização serológica deve ser realizada após o tratamento inicial. Deve constituir a avaliação contínua do doente ao longo do tratamento, devendo no contexto da LCan envolver a avaliação da resposta ao tratamento dos animais afetados (Roura *et al*, 2013). No presente trabalho, apesar de 18 dos animais terem vindo para consulta de reavaliação, apenas 10 animais (50%) fizeram a titulação de controlo (por razões económicas), 6 meses após o tratamento inicial. Após o 1º controlo, apenas 6 animais (30%) voltaram passados 12 meses para a realização de uma nova titulação, apresentando 3 dos mesmos uma titulação já negativa a LCan. Num dos animais o resultado da titulação aumentou, facto este descrito como uma recorrência (Solano-Gallego *et al*, 2009; Solano-Gallego *et al*, 2011).

Relativamente ao prognóstico dos 18 animais em que se realizaram titulações, segundo Solano-Gallego *et al* (2009), 1 animal tinha bom prognóstico, 9 tinham um prognóstico de bom a reservado, 7 tinham um prognóstico reservado a mau e 1 tinha um mau prognóstico. Nos restantes animais não foi possível atribuir um prognóstico com precisão por falta de informação.

O animal com bom prognóstico encontrava-se estável e com uma titulação já com resultado negativo. Os animais com prognóstico bom a reservado encontravam-se estáveis e em acompanhamento no HVMSI. Dos 7 animais com prognóstico reservado a mau, 3 acabaram por falecer devido a complicações renais após início de tratamento com miltefosina e alopurinol. O animal com um mau prognóstico acabou por ser eutanasiado devido a IRC (prognóstico de acordo ao atribuído no estágio IV).

Os 2 animais aos quais não foi possível atribuir um prognóstico, acabaram por ser eutanasiados por agravamento dos sinais clínicos e das análises bioquímicas.

Segundo Solano-Gallego *et al* (2009), com a melhoria clínica e a diminuição dos resultados de anticorpos obtidos na titulação, deve reduzir-se a dose, a frequência ou mesmo optar pela descontinuação do Alopurinol. Desta forma, um dos animais do presente estudo manteve-se após titulação negativa sem tratamento para LCan, encontrando-se a ser monitorizado periodicamente

Conclusão

A LCan é causada por *L. Infantum* e é uma zoonose transmitida por vectores.

Uma vez que o cão se apresenta como um hospedeiro reservatório, partilhando o mesmo habitat que o Homem, cabe ao Médico Veterinário instruir os donos para uma correta prevenção e no caso da presença da doença, de uma correta abordagem clínica e rigoroso tratamento.

No presente estudo, os animais afetados correspondiam maioritariamente a indivíduos do sexo masculino, de médio a grande porte, predominantemente de exterior, fator este passível de potenciar o contacto com o vector. O diagnóstico foi realizado na maioria entre os 4 e os 8 anos de idade, apresentando os animais na altura manifestações clínicas inespecíficas, das quais se destacavam os sinais dermatológicos. Os meios de diagnóstico mais utilizados corresponderam ao teste rápido e à serologia ELISA Leiscan.

A anemia e a azotemia foram as alterações laboratoriais mais frequentemente encontradas.

O tratamento administrado variou consoante a serologia quantitativa, os dados laboratoriais e os sinais clínicos, destacando-se como tratamento de eleição a combinação de Miltefosina com Alopurinol (de modo a eliminar os parasitas e evitar recorrências). Devido à disponibilidade económica do proprietário que também influenciou a terapêutica instituída em alguns dos casos.

A LCan apresenta um elevado impacto económico, não só pelas despesas associadas ao diagnóstico, tratamento e monitorização, como também a todas as profilaxias implementadas, nomeadamente no que diz respeito a desparasitantes, repelentes e vacinas.

Mesmo em animais vacinados podem surgir animais positivos, uma vez que a sua eficácia é de 68,4%. Desta forma, a junção de repelentes e insecticidas pode constituir uma a melhor abordagem profilática contra LCan, uma vez que ronda os 90% a 97,7% de prevenção.

O carácter económico dos proprietários tem um grande impacto no diagnóstico, tratamento e monitorização desta doença, cabendo ao Médico Veterinário adequar a melhor abordagem possível.

A LCan é uma doença que afeta principalmente os cães e qualquer órgão ou tecido dos mesmos, representando um papel importante não só na saúde dos animais de companhia, como também ao nível da saúde pública. Numa região endémica torna-se fundamental perante sinais clínicos compatíveis com a doença, esta se enquadre nos seus diagnósticos diferenciais.

Concluimos que mesmo os animais correctamente vacinados e que utilizam simultaneamente métodos profiláticos complementares (pipetas e/ou coleira), podem ser infectados e ficar doentes, uma vez que não há nenhum método profiláticos que confira 100% de prevenção contra LCan.

Referências Bibliográficas

1. Abranches, P., Campino, L., Santos-Gomes, G. M. (1998). Novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controlo da leishmaniose. *Acta Médica Portuguesa*, 11, 871–875.
2. Afonso, M. O., Alves-Pires, C. (2008). Bioecologia dos vectores. *Leishmaniose canina*, 27-40.
3. Afonso, M. O., Campino, L., Cortes, S., Alves-Pires, C. (2005). The phlebotomine sandflies of Portugal. XIII - Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrabida leishmaniasis focus. *Parasite*, vol. 12, no 1, 69-72.
4. Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votycka, J., Marty, P., Delaunay, P et al. (2016). A historical overview of the classification, evolution and dispersion of leishmania parasites and sandflies. *PLOS- Neglected Tropical Diseases*, 10(6).
5. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57, 1–88.
6. Andrade, H.M., Toledo, V.P.V.P., Pinheiro, M.B., Guimarães, T.M.P.D., Oliveira, N.C., Castro, J.A., Silva, R. N. et al. (2011). Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (=L. chagasi) in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 181 , 83-90.
7. Baneth, G., Aroch, I., (2008). Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, 175, 14–15.
8. Baneth, G., Koutinas, A., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L. (2008). Canine Leishmaniasis- new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, Vol.24, no 7, 324-330.
9. Baneth, G., Shaw, S. E. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 106, 315–324.
10. Barbiéri, C. L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 28, 329– 337.
11. Beattie L, Kaye PM (2011). Microreview Leishmania – host interactions: what has imaging taught us ?. *Cellular Microbiology*, 13(11), 1659-1667.
12. Bianciardi, P., Brovida, C., Valente, M., Aresu, L., Cavicchioli, L., Vischer, C., Giroud, L., et al. (2009). Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys. *Toxicologic Pathology*, 37, 770–775.

13. Campino, L., Maia, C. (2010). Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. *Acta Medica Portuguesa*, 23, 859-864.
14. Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J., Gomes, G., Pires, C., et al. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*, 11, 1708-1714.
15. Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G. J., Carreta, P., Varejão, E., Benthemb B.V., et al. (2004). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology*, 121, 21–32.
16. The Center for food Security & Public Health (2017). Zoonotic Disease. Leishmaniasis. Acedido a 30 de Maio de 2017 em: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease.php?name=leishmaniasis&lang=en>
17. Ciaramella, P., Oliva, G., Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *leishmania infantum*. *Veterinary record*, 141, 539-543.
18. Ciaramella, P., Pelagalli, A., Cortese, L., Pero, M. E., Corona, M., Lombardi, P., Avallone L., et al. (2005). Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Journal*, 169, 465–467.
19. Coelho, W. M. D., Lima, V. M. F., Amarante, A. F. T., Langoni, H., Pereira, V. B. R., Abdelnour, A., et al. (2010). Occurrence of *Leishmania chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(4), 256–8.
20. Companion Vector- Borne Diseases (2017). Sand fly-borne diseases. Leishmaniosis. Acedido a 31 de Maio de 2017 em: <http://www.cvbd.org/en/sand-fly-borne-diseases/leishmaniosis>
21. Cupolillo, E., Medina-Acosta, E, Noyes, H., Momen, H., Grimaldi, G. (2000). A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*, 16, 142–144.
22. Cortes, S., Afonso, M.A., Alves-Pires, C. & Campino, L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, Vol.13, no 9, 1431-1432.

23. Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L., Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 189, 189– 196.
24. Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of leishmania parasites, with emphasis on leishmania infantum and leishmania (viannia) braziliensis. *Veterinary Parasitology*, 149, 139-146.
25. Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S. P. (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 48(3), 151–156.
26. Ferreira, C., Lana, M., Carneiro, M., Reis, A., Paes, D.V., Silva, E.S., Schalling, H., et al. (2007) Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology*, 146, 235-241.
27. Ferreira, S.A., Ituassu, L.T., Melo, M.N., Andrade, R.(2008). Evaluation of the conjuntival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol*, v.152, 257-263.
28. Gluenz, E., Ginger, M. L., McKean, P. G. (2010). Flagellum assembly and function during the Leishmania life cycle. *Current Opinion in Microbiology*, 13(4), 473–9.
29. Gomes, Y.M., Cavalcanti, M.P., Lira, R.A., Abath, F.G.C., Alves, L.C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175, 45-52.
30. Gomez-Ochoa, P., Castillo, J.A. Gascón, M., Zarate , J.J., Alvarez, F., Couto, C.G. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *The Veterinary Journal* 179 259–26
31. Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*,181, 23-30.
32. Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 23–30.
33. Gramiccia, M., Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35(11-12), 1169–80.
34. Gramiccia, M., Gradoni, L. (2007). Chapter V: The leishmaniases of Southern Europe. In *Emerging Pests and Vector-borne Diseases in Europe*. Acedido em 12 de abril de 2017, disponível em: <http://www.google.pt/books?hl=pt->

- PT&lr=&id=BEs_2o58GskC&oi=fnd&pg=PA75&dq=The+leishmaniasis+of+Southern+Europe&ots=yuqSGx2MDp&sig=apfy_5tcUmvGjEs7_6Jz_wHV0xc&redir_esc=y#v=onepage&q=The%20leishmaniasis%20of%20Southern%20Europe&f=false
35. Greene, C.E. (2006). Infectious diseases of the dog and cat. (3th edition),685-698.Philadelphia: Saunders Elsevier.
 36. Koutinas AF, Koutinas CK (2014). Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*, 51(2), 527-538.
 37. Maia, C., Campino, C. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274–287.
 38. Maia, C., Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274-287.
 39. Maia, C., Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, 27(8), 341–4.
 40. Maia, C., Dionísio, L., Afonso, M. O., Neto, L., Cristóvão, J. M., & Campino, L. (2013). *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area , the Algarve Region in Portugal. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(6), 481–487.
 41. Mancianti, F. (2004). Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat. Acedido a 1 de Maio de 2017, disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/15305717>
 42. Manna, L., Corso, R., Galiero, G., Cerrone, A., Muzj, P., Gravino, A. E. (2015). Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites & Vectors*, 8, 1-9.
 43. Manna,L., Vitale, F., Reale, S., Picillo, E., Neglia, G., Vescio, F., Gravino, A. E. (2009). Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, 182 ,441-445.
 44. Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N. (2012). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 1-25.
 45. Maroli, M., Gradoni, L., Oliva, G., Castagnaro, M., Crotti, A., Lubas, G., Paltrinieri. (2010). Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*, Vol 236, no 11, 1200-1206.

46. Masucci, M., Majo, M., Contarino, R. B., Borruto, G., Vitale, F., Pennisi, M. G. (2003). Canine leishmaniasis in the newborn puppy. *Veterinary Research Communications*, 27(1), 771–4.
47. Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., Deplazes, P. (2005) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescence-antibody test, and two rapid tests for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infection in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5515–5519.
48. Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science*, 85, 35-38.
49. Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M., Oliva, G., Baneth, G. (2008). Canine Leishmaniosis-nem concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, Vol.24, no 8, 371-377.
50. Miró, G., Oliva, G., Cruz, I., Canavate, C., Mortarino, M., Vischer, C., Bianciardi, P. (2009). Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Veterinary Dermatology*, 20, 397-404.
51. Molina, R., Espinosa-Goongora, C., Gálvez, R., Montoya, A., Descalzo, M. A., Jiménez, M. I., Dado, D., et al. (2012). Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*. *Veterinary Parasitology*, 187, 529–533.
52. Moreno, J., Vouldoukis, I., Schreiber, P., Martin, V., McGahie, D., Gueguen, S., Cuisinier, A. (2014) Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) produces a cell-mediated immune response which is still presente 1 year later. *Veterinary immunology and immunopathology*, 158, 199-207.
53. Noli, C., & Saridomichelakis, M. N. (2014). An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary Journal*, 202, 425–35.
54. Oliva, G., Nieto, J., Manzillo, F. V., Cappiello, S., Fiorentino, E., Muccio, T. D., Scalone, A., et al. (2014). A Randomised, Double- Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Nave Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* Transmission Seasons. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, 1-8.
55. Oliva, G., Roura, X., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., Lubas, G. et al. (2010). Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236, 1192-1198.

56. ONLeish- Observatório Nacional das Leishmanioses. Acedido a 3 de Março de 2017 em: <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>
57. Owens, S.D., Oakley, D.A.; Marrayott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T.J., Newton, A., et al. (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*, v.219, 1076-1083.
58. Palatnik-de-Sousa, C. (2012). Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. Volume 3, Article 69.
59. Paltrinieri, S., Gradoni, L., Roura, X., Zatelli, A., Zini, E. (2016). Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Patho*, 45/4, 552-578.
60. Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Cstagnaro, M., Crotti, A.(2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*, Vol 236.
61. Pennisi, M. G., de Majo, M., Masucci, M., Britti, D., Vitale, F., Maso, R. (2005) Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Veterinary Record*. 156, 346-349.
62. Perego, R., Proverbio, D., Giorgi, G., Spada, E. (2014). Prevalence of dermatological presentations of canine leishmaniasis in a nonendemic area: A retrospective study of 100 dogs. *Veterinary Medicine International*, volume 2014, Article 374613.
63. Pereira da Fonseca, I. M., Villa de Brito, M. T. (2008). Capítulo VI: Diagnóstico. *Leishmaniose canina*, 83-92.
64. Pereira, M. A. M. (2008). Capítulo III: Epidemiologia da leishmaniose canina. *Leishmaniose canina*, 27-40. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
65. Petersen, C. A. (2010). Leishmaniasis, An Emerging Disease Found in Companion Animals in the United States. *Top Companion Animal Medicine*, 24(4), 182–188.
66. Petersen, C. A., Barr, S. C. (2010). Canine Leishmaniasis in North America: Emerging or Newly Recognized, 39(6), 1–11.
67. Plevraki, K., Koutinas, a F., Kaldrymidou, H., Roumpies, N., Papazoglou, L. G., Saridomichelakis, M. N., Savvas, I., et al. (2006). Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in Canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 20, 228–233.
68. Proverbio, D., Spada, E., Baggiani, L., Bagnagatti De Giorgi, G., Perego, R. (2013). Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence antibody test for assaying *Leishmania infantum* antibodies in dogs. *Biomed Research International*, 6.

69. Reguera, R. M., Morán, M., Pérez-Pertejo, Y., García-Estrada, C., Balana-Fouce, R. (2016). Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 227, 98-114.
70. Rolão, N., Martins, M. J., João, A., Campino, L. (2005). Equine Infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 12, 183–186.
71. Rosypal, A. (2005). Characterization of Canine Leishmaniasis in the United States: Pathogenesis, Immunological Responses, and Transmission of an American Isolate of *Leishmania infantum*. Acedido a 2 de Junho de 2017 em: <https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/26873/Rosypaldissertation.pdf?sequence=1>
72. Roura, X., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Maroli, M., Oliva, G., Paltrinieri, S. (2013). Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *The Veterinary Journal*.
73. Saridomichelakis, M. (2009). Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: Epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, 471-489.
74. Saridomichelakis, M. N., Mylonakis, M. E., Leontides, L. S., Billinis, C., Koutinas, A. F., Galatos, A. D., Gouletsou, P., et al. (2005). Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. *Veterinary Parasitology*, 130, 199–205.
75. Sharma, U., Singh, S. (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45: 255-272.
76. Silva, F. (2007). Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Trópica- Ciências Agrárias e Biológicas*, 1, 20-21.
77. Silva, F. L., Oliveira, R. G., Silva, T. M. A., Xavier, M. N., Nascimento, E. F., & Santos, R. L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160, 55–59.
78. Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-18.
79. Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P. et al. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4:86.
80. Tomás, A. M., Romão, S. F. (2008). Capítulo I: Biologia do Parasita. *Leishmanioscanina*, 7-26. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.

81. 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), 1076–81.
82. Veras, P. S. T., Fraga, D. B. M., Solca, M. S., & Guedes, C. E. S. (2014). New Advances in the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. In *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*, 239–273.
83. World Health Organization. (2014). Control of the leishmaniases. *World Health Organization Technical Report Series*, 949, 22–26.