



Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**“LEISHMANIOSE: QUE FUTURO NOS RESERVA?”**

Cláudia Silva Duarte

**Orientador**

**Dr. ° Armando José da Silva Lemos**

**Co-Orientador**

**Dr.ª Andrea Lara Martins de Oliveira**

Porto Março 2009

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**“LEISHMANIOSE: QUE FUTURO NOS RESERVA?”**

Cláudia Silva Duarte

**Orientador**

**Dr. ° Armando José da Silva Lemos**

**Co-Orientador**

**Dr.ª Andrea Lara Martins de Oliveira**

Porto Março 2009

## RESUMO

A Leishmaniose é uma das maiores doenças infecciosas do mundo e encontra-se difundida desde o Mediterrâneo, à África, ao Médio Oriente, Ásia e à América do Sul. É transmitida através da picada de um mosquito *Phlebotomus spp* e é uma doença sistémica grave, de curso lento e crónico.

A Leishmaniose tornou-se um importante problema de saúde pública, devido à sua incidência e alta mortalidade, para a qual poucos fármacos são efectivos.

O cão é apontado como o principal reservatório da doença, e, como hospedeiro doméstico é, provavelmente, o reservatório natural mais importante.

Pelo menos, vinte espécies de *Leishmania* foram identificadas, cada uma com um padrão epidemiológico único. Este facto torna mais difícil o controlo desta doença e aumenta a dificuldade em encontrar uma vacina segura e eficaz.

Nos últimos 20 anos inúmeras investigações têm sido levadas a cabo, permitindo a identificação de vários antigénios de *Leishmania* que podem ser utilizados na formulação de vacinas. Têm sido estudadas vacinas com parasitas atenuados geneticamente, subunidades-proteicas/pépidos, genes recombinantes.

Muitas destas vacinas foram testadas para a sua capacidade imunogénica e para a sua capacidade protectora, no entanto, ainda não há estudos que garantam uma vacina eficaz e duradoura.

Este trabalho procura resumir o que tem vindo a ser feito na procura de novas soluções para o controlo desta doença.

## **AGRADECIMENTOS**

Queria agradecer à mãe Paula e ao pai Luís que, tornaram tudo isto possível, com o seu apoio, carinho e amor; à mana Carolina e à sua personalidade linda; ao Bruno que me soube preencher; às minhas amigas que me acompanharam no longo deste curso e partilharam comigo longas horas de estudo, risos e boa disposição Sara, Joana, Filipa, Cláudia e Paula; às amigas que estão sempre comigo, Vera, Ticha, Sara; aos avós que sempre me souberam receber;

Aos professores que vou recordar sempre Professor Armando, Professor Paulo, Professor Pablo e Professora Cláudia;

Aos novos amigos que fiz, Ricardo, Paula e Joana;

À Dr.<sup>a</sup> Andrea, que tornou este estágio possível, concedendo-me esta oportunidade enriquecedora.

# ÍNDICE

Resumo .....	v
Agradecimentos .....	iv
Índice .....	v
Leishmaniose .....	1
Aspectos Gerais.....	1
Etiopatogenia .....	1
Epidemiologia .....	2
Patogenia.....	5
Resposta imunitária .....	7
Resposta imunitária protectora.....	8
Resposta imunitária não protectora .....	8
Manifestações clínicas .....	9
Diagnóstico.....	11
Diagnóstico clínico-epidemiológico .....	12
Diagnóstico parasitológico .....	12
Diagnóstico serológico.....	12
Intradermorreacção – Teste de Montenegro .....	14
Medição de interferão gama .....	14
Proteinograma.....	14
Técnicas biomoleculares.....	14
Tratamento .....	15
Fármacos utilizados.....	16
Novas alternativas.....	17
Controlo.....	20
Controlo do vector.....	20
“Luta” contra os reservatórios .....	20
Conclusão.....	24
Caso Clínico .....	25
Acompanhamento do caso.....	26
Bibliografia .....	28
Anexos .....	30
Anexo 1 .....	31
Anexo 2.....	32
Anexo 3.....	33
Anexo 4.....	35

## **LEISHMANIOSE**

A Leishmaniose é uma infecção parasitária, causada por protozoários do género *Leishmania*, e que afecta canídeos (incluindo cães, raposas e chacais), humanos, alguns roedores, marsupiais, preguiças, papa-formigas. Gatos, cavalos e outros equinos e primatas podem ser ocasionalmente infectados. A doença apresenta um amplo conjunto de processos patológicos, que podem ir desde quadros cutâneos a processos viscerais, devido á multiplicação do parasita dentro das células do sistema retículo endotelial do hospedeiro. (3)

Nos últimos anos, o modo como vemos a patogénese, os sinais clínicos e o tratamento da Leishmaniose mudou consideravelmente. Apareceu um novo paradigma que tem como principal consideração, que a doença resulta também de uma resposta imune inadequada, e não só de uma mera consequência da infecção pelo parasita. Actualmente estão a ser realizadas inúmeras investigações a nível imunológico e molecular, de forma a comprovar este novo paradigma. (30)

Na prática demonstra-se que nem todos os cães infectados desenvolvem a doença. A definição clássica de doença infecciosa como um processo de infecção, período de incubação e doença, tem vindo a evoluir ao longo do tempo, revelando que, nem sempre infecção é sinal de doença. (38)

## **ASPECTOS GERAIS**

A Leishmaniose é uma doença sobre a qual há indícios em esculturas e objectos de cerâmica com mais de mil anos que evidenciam a presença da doença nas Américas. Sabe-se que a doença se encontra presente em África e na Índia pelo menos desde a metade do século dezoito. (38)

Nos últimos anos o número de áreas endémicas tem vindo a aumentar drasticamente. É estimado que 12 milhões de pessoas se encontram actualmente infectadas e que anualmente cerca de 2 milhões de casos novos ocorrem. (41)

Esta infecção parasitária é importante não só por causa dos seus aspectos zoonóticos mas também porque a Leishmaniose é importante para a Medicina Veterinária pois o cão é considerado o hospedeiro principal.

Na bacia Mediterrânica os casos de Leishmaniose humana são mais comuns em pequenas crianças, mas com o aparecimento da SIDA, a Leishmaniose tornou-se uma complicação comum em adultos infectados com o HIV ou que se encontrem a tomar fármacos imunossupressores. (4,38)

## **ETIOPATOGENIA**

O género *Leishmania* pertence ao Phylum Sarcomastigophra, subphylum Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae. (3)

As *Leishmanias* apresentam duas formas no seu ciclo biológico: uma forma extracelular flagelada – promastigota – no interior do tracto digestivo do vector (flebótomo) e outra forma intracelular – amastigota

– no interior dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados.

Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* e cada uma com exigências ecológicas, vectores e hospedeiros diferentes. (37) (Quadro 1 – anexo1)

Actualmente a classificação das diferentes espécies de *Leishmania* é baseada na diferenciação por métodos bioquímicos e genéticos. Estes métodos incluem o mapeamento de péptidos de DNA, reactividade imunológica a anticorpos monoclonais, e especialmente padrões isoenzimáticos (zimodemas). As espécies de *Leishmania* que partilham as principais características são agrupadas em “complexos”. O zimodema mais comum no complexo da *L. infantum* é o MON-1. Outros nove zimodemas de *L. infantum* já foram identificados em cães da zona Mediterrânea: MON-11, MON-77, MON-108, MON-98, MON-27, MON-34, MON-37, MON-105, MON-199. (38)

A Leishmaniose pode dividir-se em três formas clínicas: a leishmaniose cutânea, a mucocutânea e a visceral. Destas formas, a Leishmaniose visceral, também conhecida como “Kala azar”, assume destaque particular, devido à elevada taxa de mortalidade em humanos infectados, sendo assim considerada um grave problema de saúde pública em vários países. (41)

## EPIDEMIOLOGIA

A Leishmaniose encontra-se distribuída mundialmente, afectando principalmente os Países Mediterrâneos, o Centro e Sul da América, a África Oriental e algumas regiões Asiáticas. É endémica em 88 países com 350 milhões de pessoas em risco, 12 milhões de pacientes e 2 milhões de novos casos por ano. (4)

Epidemiologicamente pode dizer-se que ocorrem duas situações diferentes:

- a forma zoonótica, que é encontrada principalmente na bacia do Mediterrâneo, sendo o cão a principal fonte de infecção para as fêmeas do flebótomo;
- a forma antropótica que é encontrada na África do Este, no Bangladesh, Índia e Nepal, onde a transmissão é feita de pessoa para pessoa através do mosquito. (38)

A Leishmaniose aparece em nichos ecológicos onde ocorra a coexistência de populações de parasitas, de insectos vectores e de hospedeiros vertebrados, de forma a garantir o ciclo completo do parasita. (3)

São conhecidas duas espécies relacionadas com a doença visceral: a *L. donovani* caracterizada por ser uma antroponose e a *L. infantum*, também conhecida como *L. chagasi*, que é uma zoonose onde os cães são o principal reservatório tanto nos ambientes rurais como urbanos. (37) Os cães preenchem as condições necessárias para serem considerados reservatórios de

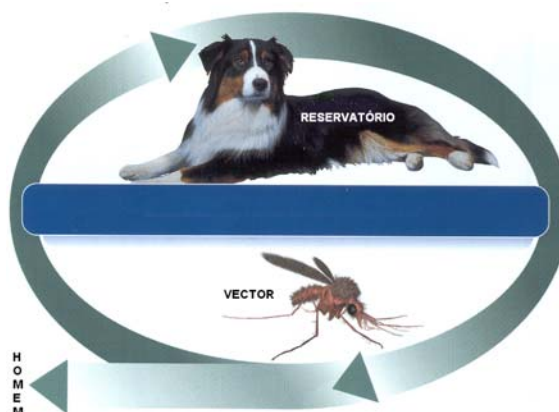


Figura 1: Transmissão da doença: cão como principal reservatório. (4)

*L. infantum*, por serem muito susceptíveis à infecção, por possuírem alto parasitismo cutâneo e pela convivência próxima com o homem. (6)

Dados serológicos disponíveis sugerem que actualmente 2.5 milhões de 15 milhões de cães podem estar infectados nos países do Sul e Este da Europa. (27)

A *L. infantum* já foi descrita noutros animais como o gato doméstico (*Felis catus*), marsupiais (*Didelphis albiventris*, *D. marsuialis*) e roedores (*Rattus rattus*, *Nectomys squamipes*, *proechimys canicollis*). No entanto não se conhece o papel epidemiológico destes animais na Leishmaniose visceral. (6)

Existem dois tipos de cães infectados: os infectantes e os não infectantes. Estes últimos são animais assintomáticos e seronegativos, nos quais a infecção foi resolvida; os cães infectantes são cães seropositivos, tanto sintomáticos como assintomáticos. (3)

Em geral, as taxas de infecção devem ser superiores às registadas, como tem vindo a ser demonstrado através da detecção de imunidade específica celular ou de ADN de parasita, em animais seronegativos.

(4) A maioria dos estudos sobre prevalência e incidência da infecção por *Leishmania* em cães são baseados em exames serológicos. É importante distinguir os diferentes tipos de prevalência na Leishmaniose canina:

- Prevalência da doença é a taxa de cães que apresentam sinais clínicos de Leishmaniose;
- Seroprevalência: a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* é o método mais simples e mais usual na determinação da infecção de *Leishmania*. A seroprevalência pode ser considerada uma medida intermediária entre a prevalência da doença e a prevalência da infecção. A serologia pode revelar a proporção de cães assintomáticos, que reapresentam estatisticamente, cerca de metade dos seropositivos;
- Prevalência da infecção é a taxa de cães que são portadores da *Leishmania*. (38)

A maioria dos estudos sobre prevalência e incidência da infecção por *Leishmania* em cães são baseados em exames serológicos. A seroprevalência no Mediterrâneo vai desde 10% a 40% dependendo da região. No entanto existem poucos estudos sobre a incidência da Leishmaniose. Contudo, estes sugerem que a taxa de infecção é muito superior às taxas encontradas nas investigações serológicas, pois muitas vezes não são contabilizados os cães assintomáticos e nem os cães com respostas do tipo celular. (38)

Em Portugal, como no resto da bacia Mediterrânea, ocorrem duas formas de Leishmaniose de forma endémica, a cutânea e

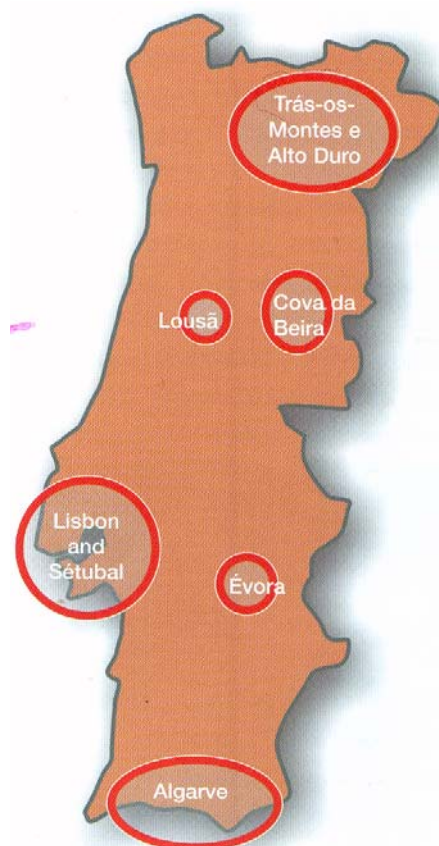


Figura 2 – Prevalência de Leishmaniose canina em Portugal. (4)

a visceral, ambas produzidas pela *Leishmania infantum*, no entanto com baixa prevalência.

Aqui podemos identificar seis áreas endémicas: Trás-os-Montes e Alto Douro, a região da Cova da Beira, o município da Lousã, a região de Lisboa e Setúbal, o município de Évora e o Algarve, no entanto a doença pode ser encontrada em todo o território continental. Os valores de seroprevalência mais recentes, vão desde 6.5% na Lousã a aproximadamente 20% em Trás-os-Montes e Alto Douro. (4)

Nos últimos anos, têm aparecido casos de Leishmaniose canina em novos locais, juntamente com um aumento do número de cães infectados nas tradicionais áreas endémicas. Devido ao aquecimento global, a latitude máxima na Europa a que o flebótomo sobrevive e se multiplica pode estar a deslocar-se para norte. Têm sido observados casos nos países da Europa do norte: Alemanha, Holanda, Reino Unido. (4)

A transmissão ocorre através de vectores, insectos hematófagos da ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, do género *Phlebotomus* no “Old World” ou do género *Lutzomyia* no “New World”. (26)

Os flebótomos são insectos pequenos com um comprimento entre 1.5-3 mm. Apenas as fêmeas têm capacidade infectante, isto é, só as fêmeas são hematófagas, pois estas necessitam do sangue para a produção de ovos. Quando a fêmea se alimenta em hospedeiros infectados, vai ingerir monócitos com as formas amastigotas, que permanecem no intestino do vector. Após um período de 12h a 18h vão transformar-se em pequenas formas ovóides e de pouco movimento, denominadas promastigotas procíclicas. Estas possuem moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) na sua superfície, que interagem com as lectinas presentes no intestino, impedindo que o parasita seja eliminado juntamente com o alimento digerido. As promastigotas procíclicas sofrem uma multiplicação intensa e 30h a 60h depois vão transformar-se em formas alongadas, finas e com maior mobilidade, chamadas nectomonas. Quando se completa a digestão do sangue ingerido (mais ou menos sete dias depois) dá-se a transformação final dando origem aos promastigotas com capacidade infectante (haptomonas). Estas vão migrar para o probóscida do mosquito. Os promastigotas possuem na sua superfície LPG e gp63 (uma glicoproteína) que vão proteger o parasita contra a acção enzimática da saliva do hospedeiro invertebrado e contra a acção das células de defesa do hospedeiro vertebrado. (6) (Esquema 1 – Anexo 2)

Quando a fêmea volta a picar, vai introduzir promastigotas na pele de um novo hospedeiro.

Existem pelo menos duas razões para os flebótomos serem os vectores naturais da *Leishmania*. O meio intestinal do flebótomo é necessário para o desenvolvimento de parte do ciclo do parasita e certos componentes da saliva garantem o estabelecimento da

infecção no local da mordedura no hospedeiro vertebrado. (26) Alguns investigadores afirmam que a saliva do flebótomo exerce um papel importante na transmissão da *Leishmania*, pois potencia a infecção

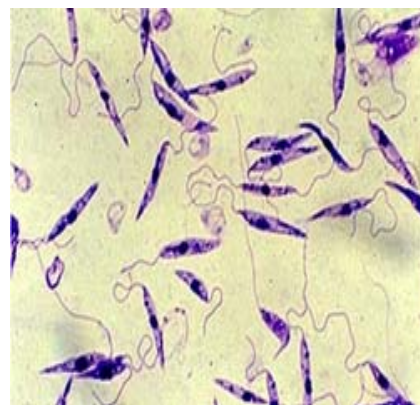


Figura 3: *Leishmanias* na forma promastigota. (14)

devido à sua capacidade anticoagulante e ao seu poder vasodilatador (6)

Em geral, os flebótomos necessitam de temperaturas médias 15-20°C, protecção da luz solar directa, humidade moderada e de abundância de detritos orgânicos. Os mosquitos adultos mostram actividade de forma estacional, nos meses de Abril a Outubro, durante o início e o fim do dia. (2)



Figura 4: Mosquito do género *Phlebotomus*.(34)

## PATOGENIA

A relação entre *Leishmania* e o cão é muito complexa, uma vez que depende de muitos factores, tanto relacionados com o parasita como com o hospedeiro. Esta relação leva a que se registem um conjunto de situações muito distintas, que vão desde a ausência da doença, ao aparecimento de processos muito graves, com quadros clínicos variados.

Infeções naturais em cães, podem permanecer assintomáticas por longos períodos de tempo, antes que os sinais clínicos apareçam e foi já demonstrado que, cães seropositivos assintomáticos podem desenvolver auto-cura. (37)

De entre os factores dependentes do parasita, o mais importante é a espécie e dentro desta o perfil enzimático (zimodema), considerando-se que diferentes perfis enzimáticos apresentam diferentes graus de virulência e antigenicidade, provocando diferentes respostas no hospedeiro. (3,38)

No hospedeiro, podemos considerar como factores primários, a constituição genética e directamente relacionado com esta, a resposta imunitária, que condicionam a resistência ou a fragilidade à infecção. A capacidade imunitária do hospedeiro é decisiva para que ocorra infecção, assim como o seu desenvolvimento e a natureza do processo patológico. (3)

Estudos realizados demonstram a influência da genética: o gene NRAMP1 (*Slc11a1*) ao ser mapeado e sequenciado, possibilitou comprovar que cães susceptíveis à Leishmaniose canina têm mutações neste gene, que controla o transporte de iões envolvido no controlo da multiplicação dos parasitas dentro do fagossoma; a raça Ibizian Hound (raça autóctone espanhola) apresenta predominantemente uma resposta imune celular contra a infecção de *Leishmania*, conferindo a estes animais protecção/resistência contra a doença. (8)

Os factores secundários não são menos importantes: o estado sanitário e nutricional, que em grande parte são difíceis de separar da capacidade imunitária, uma vez que condicionam a fisiologia e a capacidade de resposta geral do organismo. (3)

Para que haja doença, primeiro é necessário que a infecção ocorra, o que implica que o parasita penetre na célula fagocítica e uma vez no seu interior, resista à sua acção microbicida.

A entrada das *Leishmanias* nos macrófagos ocorre através de um processo de fagocitose regido pela interacção da fracção C3 do complemento, moléculas da superfície do parasita, tais como a maior

glicoproteína de superfície – gp63 – e o lipofosfoglicano – LPG – e diversos receptores de membrana do macrófago.

Após internalização, as formas promastigotas, vulneráveis, a acidez e acção das enzimas líticas do vacúolo fagocítico, diferenciam-se em formas amastigotas. Estas, multiplicam-se por divisão binária até ao rompimento do macrófago infectado. Desta forma libertam-se as formas amastigotas que vão infectar outras células do sistema mononuclear fagocitário. (6)



Figura 5: Macrófago a fagocitar uma *Leishmania*, imagem de microscopia electrónica. (19)

A forma amastigota tem a capacidade, através de mecanismos intrínsecos, de resistir à acção das enzimas hidrolíticas lisossomais e aos radicais livres de oxigénio (RLO). A gp63 e a LPG degradam a maioria das enzimas hidrolíticas lisossomais e inibem a produção de radicais livres de

oxigénio; além disso, a *Leishmania* possui certas enzimas (catalase e superóxido dismutase) que contrariam a acção dos radicais livres de oxigénio.

As formas amastigotas evitam os mecanismos microbicidas, dependentes do oxigénio e os do óxido nítrico (NO), que ocorrem com a activação dos macrófagos. Certas citoquinas, que induzem a activação dos macrófagos, promovem o metabolismo oxidativo e a síntese de NO. A *Leishmania* escapa a estes mecanismos porque, ao induzir uma resposta imunitária do tipo Th2, bloqueia a activação do macrófago. (3)

É na pele, no ponto em que o flebótomo inoculou os promastigotas, que se inicia a parasitação dos macrófagos, onde ocorre uma reacção inflamatória localizada com activação do complemento por via alternativa, atraindo para a zona mais macrófagos, histócitos, monócitos e neutrófilos, que iniciam o processo de fagocitose das formas parasitárias presentes. A partir do ponto de inoculação, as *Leishmanias* vão disseminar-se dentro dos macrófagos, através da corrente sanguínea ou através da linfa. (6)

Uma das características da Leishmaniose canina é a distribuição generalizada do parasita por todo o organismo, sendo as localizações mais importantes: o baço, os gânglios linfáticos, a medula óssea, o fígado, os rins e a pele.

Existem dois elementos fundamentais que justificam a patogenicidade da *Leishmania*:

- O primeiro elemento resulta do facto do parasita se encontrar e multiplicar nas células do sistema fagocítico mononuclear. Esta situação vai originar uma alteração funcional, com diminuição da capacidade fagocítica e da sua actividade como célula apresentadora de antigénio, bem como vai originar a destruição da célula parasitada;
- O segundo elemento traduz-se na grande variedade de alterações que se produzem durante a infecção, uma reacção parcialmente imunomediada, resultado de uma resposta imunitária ineficaz, em que os mecanismos celulares e humorais constituem elementos imunopatológicos. (3)

Os mecanismos imunitários celulares vão originar um processo reactivo tecidual, mais ou menos

generalizado, caracterizado por uma reacção inflamatória de tipo proliferativo, produzindo processos degenerativos e necróticos à medida que se espalha pelos diferentes órgãos.

Na resposta humoral, o mecanismo mais importante é a formação e o depósito de complexos imunes circulante (CIC), que se formam através da união de um antigénio *Leishmania*, de uma IgG ou IgM específica e de fracções do complemento (especialmente C3). Os CIC alteram a capacidade fagocítica dos monócitos e neutrófilos circulantes, interferem nos mecanismos de agregação plaquetária e estimulam a libertação de aminas vasoactivas. Para além disso, o depósito dos CIC sobre o endotélio vascular, dá origem a uma reacção de hipersensibilidade medida por imunocomplexos (Tipo III), na qual ocorre uma activação do sistema de complemento e uma activação das células inflamatórias que, vão provocar alterações da permeabilidade vascular e fenómenos de necrose tecidual. É o rim, o órgão mais comumente afectado pela deposição dos CIC na membrana basal glomerular, originando uma glomerulonefrite, que conduz muitas vezes à morte do animal. (2,3,12,26)

## RESPOSTA IMUNITÁRIA

A resposta imunitária vai condicionar toda a evolução da infecção, desde o início à resolução do processo patológico. Pode ocorrer um processo eficaz de protecção, que evita a disseminação da infecção e elimina o parasita ou pode ocorrer a disseminação da infecção, porque o sistema imunitário não consegue destruir o parasita. (3,8)

Existem portanto cães que desenvolvem resistência e que por isso nunca manifestam a doença e cães que não têm uma resposta eficaz e protectora, podendo instaurar-se um processo patológico, apresentando sintomatologia ou permanecendo assintomático no entanto, com capacidade infecciosa. (6)

A capacidade de resistência a doença está associada com a activação das células Th1 que produzem de interferão gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2) e factor de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Uma resposta do tipo Th1 parece depender de um conjunto de diferentes factores: da genética do hospedeiro, das citocinas presentes e da natureza dos antigénios da *Leishmania*. Alguns estudos recentes demonstram que a susceptibilidade à doença pode estar associada com polimorfismos de proteínas de macrófagos e dos alelos do MHC II. Em Espanha, o Ibizian Hound, como atrás foi referido, parece apoiar este facto, uma vez que vivendo numa área endémica de Leishmaniose canina, raramente desenvolve a doença. (1)

As citocinas têm um importante papel no que toca ao desenvolvimento das células T e a IL-12 é necessária para induzir e manter uma resposta Th1. (3)

A Leishmaniose sintomática (ou seja, a infecção propriamente dita) em cães tem sido associada a alterações imunológicas envolvendo as células T. Estas alterações incluem a ausência de uma reacção de hipersensibilidade do tipo IV ou retardada (DHT) aos antigénios da *Leishmania*, a diminuição do número de células T no sangue periférico, a ausência da produção de IFN- $\gamma$  e de IL-2 por parte das células mononucleares periféricas. Para além disso, nos animais sintomáticos são detectados altos títulos de anticorpos anti-leishmania, que não são imunoprotectores. (1)

### **Resposta imunitária protectora**

As populações celulares que estão directamente implicadas são os macrófagos. É a população de linfócitos helper Th, CD4+, a responsável pelos mecanismos que vão activar as células efectoras. Os macrófagos são as principais células efectoras, que são activados por diversas citocinas para destruir intracelularmente as amastigotas de *Leishmania*. (1,3)

A resposta celular inicia-se com a actuação das células apresentadoras de antígeno (CPA), que são macrófagos que tenham fagocitado o parasita e que apresentam antígenos do parasita associados às moléculas do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC) da sua membrana externa. O complexo antígeno-molécula MHC II é reconhecido pelos receptores de membrana dos linfócitos Th CD4+, que vão promover uma determinada resposta, de acordo com a subpopulação (Th1 ou Th2) de linfócitos que for activada. (38)

Quando a subpopulação Th1 é activada ocorre uma produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF (factor de necrose tumoral), que induz a activação dos macrófagos, a destruição intracelular do parasita por acção do NO, assim como estimula uma resposta linfoproliferativa e uma reacção de hipersensibilidade do tipo retardado. (3, 37)

Outra citocina importante no atraso do aparecimento da infecção é a IL-12, que induz e mantém a resposta do tipo Th1. (35) A IL-12 é produzida pelos macrófagos activados pela *Leishmania*. Esta citocina liga-se as células T activadas e inicia a diferenciação para o tipo Th1. (12)

Também o IFN- $\gamma$  está envolvido no desenvolvimento de uma resposta Th1, pois este regula positivamente a produção de IL-12 e ao mesmo tempo inibe a proliferação do subgrupo Th2. O INF- $\gamma$  vai promover uma produção de IgG2a pelas células B, ao mesmo tempo inibe a produção de IgG1 e de IgE. (34) Nos animais que desenvolvem uma resposta imunitária protectora, mediada por linfócitos Th1, a produção de anticorpos é menor, podendo mesmo não existir. (3)

### **Resposta imunitária não protectora**

Nos animais susceptíveis, com uma resposta celular do tipo Th2, a produção de anticorpos é muito grande.

A subpopulação Th2 está, então, associada à progressão da doença. Ao produzir IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 estas vão inibir a activação dos macrófagos e as respostas linfoproliferativas e por outro lado vão promover a proliferação dos linfócitos B e a produção de imunoglobulinas, levando a uma resposta imunitária do tipo

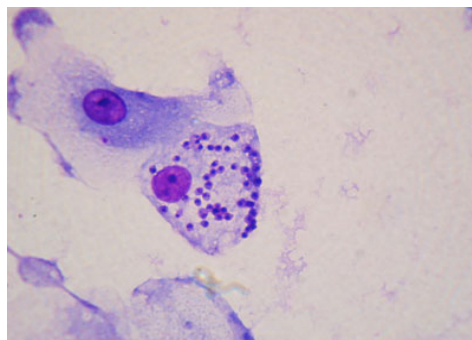


Figura 6: Macrófagos com *Leishmanias* no seu interior. (20)

humoral. O predomínio de uma resposta tipo Th2 justifica os estados de imunossupressão, imunodepressão ou anergia imunitária na Leishmaniose canina. (3) Tal como as células Th1 necessitam da IL-12 e do IFN- $\gamma$ , a geração das células Th2 depende da IL-4. O desenvolvimento da subpopulação

Th2 é fortemente favorecido em detrimento de Th1, mesmo quando na presença de IL-12. As citocinas IL-4 e IL-10 vão regular negativamente a secreção de IL-12, inibindo a diferenciação das células numa subpopulação Th1, diminuindo assim a resposta celular. (12)

Ocorre também uma alteração funcional nos macrófagos, que vai afectar a sua função de apresentação de antígenos e supõe-se ainda que estes exercem uma actividade imunossupressora específica sobre a subpopulação de linfócitos Th1. A sua capacidade fagocítica também se encontra alterada, porque a sua capacidade de produzir RLO e NO, os principais mecanismos de destruição intracelular na fagocitose, está diminuída. (38)

Por outro lado a produção de IL-4, vai promover a produção da IgG1 e da IgE. (27)

A produção de anticorpos específicos, inicia-se durante as primeiras semanas e, por volta das 8-12 semanas podem encontrar-se níveis séricos consideráveis (títulos acima dos limites considerados para positividade). À medida que o processo avança nos animais susceptíveis, os valores vão sendo cada vez maiores, pelo que se pode estabelecer uma relação directa entre os níveis de anticorpos e o estado clínico dos animais infectados. (3,12)

Estes anticorpos reconhecem uma grande variedade de determinantes antigénicos do parasita. Encontrou-se um padrão de reconhecimento antigénico praticamente constante em todos os cães infectados, onde as bandas proteicas 90-94 KDa, 64-68 KDa, 28-30 KDa e 14-16 KDa são as mais destacadas. Através de técnicas bioquímicas e imunológicas identificam-se anticorpos que reconhecem de forma específica os principais componentes da membrana do parasita, o LPG e a gp63. (3)

Outras proteínas têm vindo a ser identificadas: P2, P0, Hsp70, Hsp83, GRP94, rK39, KMP-11, H2B, gp70, PSA. Num estudo realizado, em cães infectados, mas que não apresentavam sinais da doença, as proteínas gp63, gp70 e rK39 não foram reconhecidas nos testes ELISA e Western blot, sugerindo que estas proteínas possam ser usadas para identificar animais com doença patente. (6)

## **MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

Devido a complexidade dos mecanismos imunopatológicos, a Leishmaniose canina reúne um conjunto muito variado de processos clínicos. (38)

Existem as formas latentes que normalmente são assintomáticas. Estas formas podem ser recessivas, que correspondem aos animais que controlam a infecção devido a uma resposta celular do tipo Th1, ou ser evolutivas, onde se desenvolve a forma patente/sintomática da doença. As formas patentes podem dividir-se em:

- Oligossintomáticas ou polissintomáticas;
- Cutâneas, viscerais e viscero-cutâneas;
- Agudas, sub-agudas, crónicas. (3)

Tanto a Leishmaniose natural como a induzida experimentalmente, apresentam um período de incubação que pode ir de um mês a sete anos.

A manifestação inicial mais comum é uma alteração do estado orgânico geral, com perda constante de peso, acompanhada de astenia, apatia e em certos casos anorexia e febre, o que se denominou por síndrome geral inespecífico, de começo insidioso e de progressão constante.

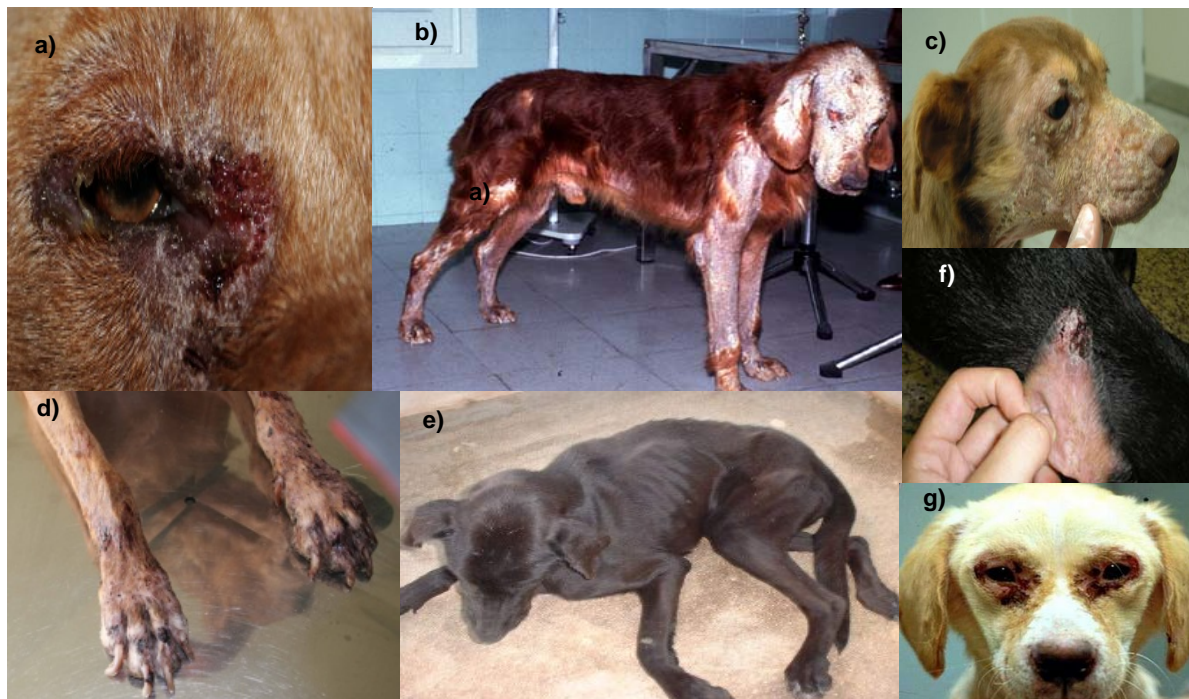


Figura 7: a) Cão com blefarite (18); b) Cão com alopecia(24) ; c) Cão com hiperqueratose no nariz (18); d) Onicogribose (18); e) Emaciação (16); f) Lesão ulcerativa na orelha (17); g) Alopecia na zona ocular (16).

As alterações cutâneas são muito comuns podendo variar na extensão e na caracterização. As mais comuns são: dermatites esfoliativas, seborreicas, papulares, nodulares e ulcerativas; pústulas; despigmentação nasal; hiperpigmentação; alopecia; hiperqueratose; descamação; e onicogribose. (3,38)

As linfadenopatias, tanto generalizadas como localizadas, também são muito comuns. Os gânglios linfáticos mais afectados são os poplíteos, os pré-escapulares e os submaxilares. (3)

A base do quadro lesional de todos os órgãos afectados resulta de um processo reactivo, que se pode considerar como padrão na Leishmaniose, caracterizado por uma reacção inflamatória proliferativa e crónica, com um infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, linfócitos e células plasmáticas, juntamente com processos degenerativos e necróticos. As lesões mais importantes ocorrem nos rins, o fígado, os órgãos linfóides e a pele. (3,6)

As alterações mais comuns a nível renal são as glomerulonefrites, em consequência de lesões (degenerativas e necróticas) tubulares e glomerulares juntamente com a deposição de imuno-complexos. Este quadro leva a uma proteinúria que pode progredir para um síndrome nefrótico ou a uma insuficiência renal. (32)

No fígado são induzidas alterações na morfologia dos hepatócitos pelo parasita e consequentemente no metabolismo do órgão. (32) A lesão mais característica é uma infiltração crónica proliferativa, que leva a

alterações vasculares e a alterações degenerativas dos hepatócitos. (3) No entanto segundo alguns autores as hepatopatias e as hepatomegalias associadas à Leishmaniose canina são raras. (32)

No baço a principal lesão é uma inflamação hiperplásica da polpa branca e da polpa vermelha. As alterações mais importantes que ocorrem na polpa branca são devidas a uma clara disfunção linfocitária, com redução e atrofia dos folículos linfóides. Na popa vermelha observam-se fenómenos de hiperémia e microhemorragias e sobretudo uma hiperplasia muito marcada das células reticulares, que leva a uma desorganização da estrutura esplénica. (3)

Nos gânglios ocorre uma linfadenite hiperplásica, que começa com alterações do tipo vascular (hiperémia) e com hiperplasia das células reticulares nos seios medulares. É característica a presença de grande quantidade de hemosiderina no citoplasma das células reticulares.



Figura 8: Cão com epistáxis. (18)

As oftalmopatias, como alopecias perioculares, blefarites, conjuntivite, queratite e uveíte anterior, podem ocorrer simultaneamente com outros sinais sistémicos.

Cerca de 5% a 10% dos cães apresentam epistaxis, que pode estar relacionada com lesões inflamatórias e ulcerativas na mucosa nasal. (6)

Foram também descritas outras lesões, embora apareçam com menor frequência, como por exemplo: lesões no sistema nervoso central e nas articulações por deposição de imunocomplexos e vasculites com fenómenos de trombose.

O facto de se tratar de doença imunomediada, torna-se frequente o aparecimento de infecções oportunistas concomitantes, tais como cistites, pneumonias bacterianas, sarnas e micoses.

O quadro lesional da Leishmaniose canina é acompanhado por uma série de alterações analíticas, que são muito variáveis. De entre as mais frequentes destaca-se a anemia progressiva, que agrava à medida que a doença avança. A sua causa é muito variável e há casos em que predomina uma anemia do tipo normocítica e hipocrómica e noutros casos do tipo normocítica e normocrómica. É comum ocorrer leucopénia mais ou menos marcada, com linfopénia e monocitose. Uma alteração muito característica da Leishmaniose é uma hipergamaglobulinémia, acompanhada por uma hipoalbuminémia. A relação entre a albumina/globulina é, normalmente, muito inferior a 0.5. Ocorrem também elevações progressivas dos parâmetros indicativos da função renal (ureia, creatinina) à medida que a doença progride. (3, 6, 32)

## DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da Leishmaniose é uma tarefa complexa. Os resultados das diferentes técnicas devem ser interpretados correctamente. Por exemplo um exame PCR positivo apenas significa que o animal está infectado; títulos serológicos altos são indicativos de infecção e de uma resposta humoral, normalmente associada ao desenvolvimento de sinais clínicos. Não existe apenas um teste que dê um diagnóstico

definitivo de Leishmaniose. Devem ser combinadas diferentes técnicas para estabelecer um diagnóstico adequado. (38)

Após o diagnóstico ser feito é importante avaliar o sistema imunitário do cão para especificar o tipo de resposta imune contra a *Leishmania*. Esta avaliação deve ser realizada, também, durante e após o tratamento. (8)

### **Diagnóstico clínico-epidemiológico**

O diagnóstico baseado em dados epidemiológicos, anamnésicos, exploratórios e analíticos, é muitas vezes utilizado para o diagnóstico da doença, devido ao amplo espectro sintomático que frequentemente se desenvolve na Leishmaniose.

A realização deste tipo de diagnóstico é mais clara em animais de zonas endémicas que apresentem a conjugação do quadro sintomático básico (adenopatias, lesões cutâneas, emaciação, omicogripose, ect.) com dados analíticos como anemia, hiperproteinémia com hipergamaglobulinémia. No entanto, o diagnóstico clínico é mais difícil quando se trata de casos esporádicos, de animais com sintomatologia anormal ou em fases latentes ou iniciais. (3)

### **Diagnóstico parasitológico**

Este tipo de diagnóstico pretende evidenciar a presença do parasita em amostras provenientes do animal doente. É um método de especificidade total, no entanto a sensibilidade não é muito alta, pois está dependente de outros factores como o modo de recolha da amostra, da fase da doença e da carga parasitária. (3)

O procedimento de eleição no cão é a biopsia por aspiração de tecido proveniente de gânglios linfáticos ou de medula óssea. Quando feita nos gânglios é uma técnica rápida, de fácil realização, que em muitas ocasiões, permite a visualização do parasita. A punção medular realiza-se na face interna do fémur e devido à elevada concentração de parasitas neste tecido, considera-se um método mais sensível, no entanto mais difícil de realizar. (6)

Podemos ainda usar meios indirectos para detectar o parasita como o isolamento do parasita em meios de cultivo (o parasita cresce em meios bifásicos, como o NNN (novy-mac-neal-nicolle), semisólidos como agar-sangue semisólido de Locke, entre outros; demora entre 6-15 dias a crescer leishmanias) ou por inoculação em animais de laboratório. (3,38)

### **Diagnóstico serológico**

O objectivo deste tipo de diagnóstico é mostrar a existência de anticorpos específicos anti-leishmania, normalmente do tipo IgG. São métodos serológicos com alta sensibilidade e especificidade, cuja principal limitação é a incapacidade de diagnosticar a doença quando não se produzem anticorpos: durante o

período de seroconversão, entre 1.5-3 meses após a infecção e quando se produzem baixas quantidades de anticorpos (possíveis animais resistentes). (3)

Os mais usados actualmente são:

- Imunofluorescência indirecta (IFI)

Baseia-se na capacidade das moléculas de anticorpo se ligarem covalentemente a fluorocromos sem perder sua reactividade específica com o antígeno. (12)

É um método muito utilizado que de acordo com diferentes estudos demonstra sensibilidade variando entre os 83% a 100% e especificidade entre os 74% a 100%. Esta técnica é muito utilizada e é também o teste recomendado pela OIE (Office International des Epizooties). (6)

- Método imunoenzimático (ELISA)

É baseado na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas e permitem a detecção, titulação e quantificação de substâncias de interesse biológico. O teste detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos. (12)

Este método apresenta sensibilidade que oscila entre os 97% a 100% e especificidade entre 88% a 100%. (6)

- Aglutinação directa (DAT)

Na reacção de aglutinação directa utilizam-se partículas antigénicas insolúveis na sua forma completa ou fragmentada. Os protozoários podem ser aglutinados directamente por anticorpos. Os testes para detectar anticorpos específicos são realizados empregando-se diluições em série do anticorpo, frente a uma quantidade constante de antígeno. Após um período de incubação, a aglutinação é concluída e o resultado é geralmente expresso como o título do anti-soro, isto é, a máxima diluição em que ocorre a aglutinação. (12)

É também uma técnica com elevada especificidade e sensibilidade, cuja maior vantagem é o seu baixo custo e a sua simplicidade de aplicação, pois não é necessário nenhum equipamento específico para a sua realização. (3)

- Imunotransferência (imunoblot)

Um método que utiliza anticorpos para detectar proteínas separadas por electroforese em gel de poliacrilamida-SDS. (12)

A sua sensibilidade e especificidade são muito altas; permite detectar anticorpos específicos e também determinar a sua especificidade perante fracções antigénicas específicas do parasita. É uma técnica complexa, mas está indicada para a resolução de casos duvidosos. (3)

### - Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é usada para contar células e diferenciá-las de acordo com a sua fluorescência, isto é, se se encontrarem marcadas com um anticorpo fluorescente. No caso da Leishmaniose esta técnica tem sido estudada para a identificação de casos de Leishmaniose canina, mais especificamente para avaliar a resposta humoral e contar os diferentes tipos de subpopulações de linfócitos: CD3+ ou CD5+ (Células T), CD21+ (células B), Th (CD4+), Tcitotóxicas (CD8+). Cães com leishmaniose apresentam uma diminuição das células CD4+ e de células B (CD21+). (8, 33)

### **Intradermorreacção – Teste de Montenegro**

Este teste é baseado numa reacção de hipersensibilidade retardada, usado muito em humanos e possui sensibilidade variando entre 86% e 100% e especificidade de aproximadamente 100%. (39) Estudos realizados demonstram que, cães com formas clínicas recessivas apresentam reacções positivas e em cães com a forma aguda e crónica apresentam reacções negativas.

A intradermorreacção pode vir a ser uma ferramenta útil para detectar animais com uma forte resposta imune celular, a qual oferece resistência contra a infecção. (37)

Esta técnica é fácil de realizar e é barata e está bem relacionada com a intensidade da resposta imune mediada por células. (8)

### **Medição de interferão gama**

O interferão gama é produzido pelas células mononucleares periféricas após estimulação com *Leishmania*, logo a sua medição pode ser uma ferramenta útil para avaliar a imunidade mediada por células. No entanto, esta medição exige um método complexo, que não é útil para o dia a dia. (8)

### **Proteinograma**

A fracção proteica do plasma é composta principalmente de albumina, globulinas e fibrinogénio. O proteinograma é útil no diagnóstico de Leishmaniose pois, nesta doença ocorre normalmente uma gamopatia monoclonal, isto é, um clone de plasmócito produz o mesmo tipo de imunoglobulinas, migrando estas para a zona gama do proteinograma. (32)

### **Técnicas biomoleculares**

Nos últimos anos tem-se aplicado várias técnicas baseadas na detecção de fragmentos de ácidos nucleicos (DNA) do parasita em tecidos do hospedeiro. Deste modo, é possível realizar um diagnóstico definitivo de infecção, superando assim as limitações do diagnóstico imunológico. (3)

Dentro deste tipo de técnicas, é o PCR a técnica mais utilizada e aquela que apresenta melhores resultados em relação à especificidade e sensibilidade. (6)

## TRATAMENTO

O tratamento da Leishmaniose é um tópico de grande controvérsia. Se por um lado temos os animais infectados, que são cães que necessitam de tratamento médico pois encontram-se afectados por uma doença com uma determinada possibilidade de resolução terapêutica, por outro, temos animais infectados que constituem o reservatório mais importante da doença para a espécie humana.

Este facto requer uma grande atenção no que toca ao controlo sanitário e à saúde pública, que necessita de vigilância e cuidados especiais. Desde que o cão é considerado o maior reservatório da Leishmaniose visceral humana, as campanhas de controlo da Leishmaniose visceral canina normalmente têm o intuito de reduzir o risco de infecção nas pessoas e não proteger o cão. A OMS recomenda o sacrifício de todos os animais infectados, no entanto reconhece que este procedimento, nos dias de hoje, tem as suas limitações e não se enquadra nos programas globais de controlo. (3,37,41)

No Brasil, uma das principais medidas de controlo para prevenir a doença humana passa pela detecção e eliminação dos cães seropositivos. No entanto, alguns autores têm demonstrado que existem outros reservatórios que podem ter um papel relevante na transmissão da doença ao homem, como por exemplo o gambá, um marsupial típico das Américas e o próprio homem. Esta medida causa grande impacto nos proprietários, pois o cão ocupa um papel dentro do núcleo familiar, sendo assim de difícil adaptação, sendo certo que os resultados em relação ao controle da doença ainda não estão comprovados. (37) Para além disso estudo matemáticos que comparam os diferentes métodos de controlo da Leishmaniose visceral humana e canina indicam que pulverizar com insecticidas possivelmente seria um método de controlo mais eficaz. (37)

O tratamento do cão não obtém a cura, mas pode oferecer uma boa qualidade de vida e maior longevidade aos animais afectados. Este procedimento exige aos proprietários um compromisso para com os animais.

A OMS reconhece que a eutanásia dos cães infectados, na maioria dos países, reserva-se cada vez mais para casos especiais, pois a maioria dos veterinários prefere administrar um tratamento e acompanhar atentamente as recaídas.

É, em zonas endémicas de baixa incidência da Leishmaniose, como a zona Mediterrânica, onde o tratamento é mais viável. Mesmo assim, a sua aplicação é difícil, uma vez que o tratamento é longo, muito dispendioso e só parcialmente eficaz. Na maioria dos casos não se consegue eliminar totalmente os parasitas, só se consegue uma remissão dos sinais clínicos e uma diminuição da capacidade infectante para os flebótomos (por 4 meses). Normalmente ocorrem recidivas da doença mais tarde. (3)

A ineficácia do tratamento ainda não se encontra plenamente esclarecida, no entanto pode estar relacionada com factores como a localização intracelular do parasita, o desenvolvimento de resistência aos fármacos e a necessidade de uma resposta imunitária celular que acompanhe a acção dos fármacos. (3)

A aplicação de um tratamento adequado requer um diagnóstico precoce, uma avaliação do estado sanitário e imunitário do animal e uma selecção cuidadosa do fármaco e da sua dose e duração.

O tratamento só deve ser inicializado após uma avaliação clínica completa e de um perfil laboratorial do paciente, que inclua a confirmação do diagnóstico serológico e determinação do título final de positividade, necessário para o acompanhamento da resposta ao longo do tratamento; presença do parasita em amostras de pele/gânglios linfáticos/medula óssea; hemograma completo, do perfil renal, hepático e electroforético das proteínas séricas. (8 ,23)

### **Fármacos utilizados**

#### **Antimoniais pentavalentes**

Os fármacos de primeira escolha no tratamento da Leishmaniose canina são os antimoniais – o **antimoniato de meglumina** e o **estibogluconato de sódio** são largamente utilizados na Europa e noutras partes do mundo. Estes fármacos actuam inibindo enzimas do protozoário que são utilizadas na oxidação de ácidos gordos e glicosídeos. (3, 6)

O mais usado actualmente é o antimoniato de meglumina (Glucantime®). Geralmente aplicam-se doses diárias de 100 mg/kg, por via subcutânea, intramuscular, durante 40 dias, repetindo o tratamento, depois de um período de descanso que pode ir dos 15 aos 30 dias. (9)

Uma grande percentagem de animais tratados mostra uma clara recuperação clínica. Apesar da alta toxicidade associada a estes medicamentos, nos cães parece que os efeitos adversos são reduzidos. (9)

Estudos demonstram ainda que, o uso do antimonial em cães poderia ser recomendado como forma de controlo na doença canina, pois mostrou ser capaz de prevenir o desenvolvimento da doença em 90% de cães assintomáticos. (36)

Ao usar-se antimonial e alopurinol no tratamento verificou-se que, para além da melhora clínica, houve redução ou eliminação completa dos parasitas da pele e os animais mantiveram-se não infectantes para os flebotomos, pelo menos por um período de quatro meses após o tratamento. (6)

#### **Derivados das purinas**

O **alopurinol** é um fármaco da classe das hipoxantinas. Ao ser metabolizado pelo parasita vai ser produzido um análogo inactivo da iosina; este análogo é incorporado no RNA do parasita causando síntese errónea de proteínas. (6) Este fármaco demonstrou uma grande actividade leishmaniosstática, de baixa toxicidade e tem a vantagem de ser administrado por via oral. É administrada a quantidade de 15 a 30 mg/kg, duas vezes ao dia, normalmente durante largos períodos de tempo. Alguns autores defendem que a sua administração prolongada previne a ocorrência de recidivas. (3)

Este fármaco induz uma gradual remissão dos sinais clínicos, uma recuperação das anormalidades clínicas e uma diminuição do nível de anticorpos circulantes; no entanto o fármaco não consegue promover a cura, apesar de haver uma considerável diminuição da carga parasitária. (6)

## Outros fármacos

- *Antibióticos*

Recentemente a **aminosidina** (paromomicina) foi comparada com antimoniato de meglumine podendo vir a ser uma alternativa a este composto. A aminosidina é um antibiótico do tipo aminoglicosídeo, com uma forte actividade anti-leishmania, podendo ser usada sozinha ou em conjunto com os antimoniais. O seu mecanismo de acção é baseado no bloqueio da ligação do RNA à unidade 30S dos ribossomas, o que leva a alterações da produção proteica por parte do parasita. (6)

A **anfotericina B** é usada quando os antimoniais falham. Esta tem sido usada com sucesso na Leishmaniose humana. Em Itália este antibiótico é considerado o fármaco de eleição para o tratamento da Leishmaniose humana. No entanto, pacientes com infecções concomitantes do vírus da SIDA não respondem ao tratamento, nem com altas doses do medicamento. (4) É primariamente um fármaco fungicida, possui no entanto actividade contra algumas espécies de protozoários. O seu mecanismo de acção é baseado na ligação do fármaco ao ergosterol da membrana celular da *Leishmania*, que vai provocar uma desorganização na membrana, formando poros que alteram a permeabilidade ao potássio intracelular, levando à morte do parasita, por lise osmótica. A sua toxicidade está associada a uma diminuição da taxa de filtração por parte do rim, aumentando assim os níveis de ureia, creatinina. (6)

- *Diamidinas*

A **pentamidina** é um fármaco de segunda escolha no tratamento da leishmaniose, quando há falha na resposta aos antimoniais. A pentamidina é efectiva contra todas as formas de leishmaniose. No entanto é altamente tóxica, uma grande percentagem de pacientes não responde ao tratamento e as taxas de recaídas são altas. A pentamidina actua contra a leishmania destruindo complexos mitocondriais de ADN. (3,6)

## Novas alternativas

Há uma busca constante de novas moléculas que sejam eficazes no tratamento da doença no cão.

De entre os novos fármacos são de particular interesse as **lepidinas** que apresentam uma actividade leishmanicida intensa nos diversos ensaios a que foi sujeita. (3)

Também a **miltefosina** (éter de fosfatidilcolina do hexadecanol) tem vindo a ser usada no tratamento da Leishmaniose. A miltefosina é uma alquilfosfocolina desenvolvida inicialmente como um quimioterápico anti-neoplásico. Em 1992, foi aprovada na Índia como o primeiro tratamento oral para a Leishmaniose visceral em humanos. É muito activa nesta forma de Leishmaniose e supõe-se que também o seja nas formas tegumentares da Leishmaniose. No entanto, a sua potência varia de acordo com a espécie de *Leishmania*: é máxima contra a *Leishmania donovani* e mínima contra *Leishmania major*. Nos mamíferos,

vai actuar a nível do metabolismo lipídico das membranas, induzindo alterações de sinalização e apoptose das células. A miltefosina actua na formação da membrana plasmática do parasita, embora funcione também como imunomodulador, activando os linfócitos T, leucócitos e plaquetas. Actua também contra *Trypanosoma cruzi* e *Entamoeba*. (15) Actualmente, determinou-se que, a dose mais adequada ao cão é 2-3 mg/kg/dia. A facilidade de administração e a eficácia da miltefosina, demonstrada em diferentes estudos, leva a que venha a ser um tratamento muito promissor. Os principais efeitos colaterais são vómitos e diarreia, pelo que deve ser administrado juntamente com as refeições. (6,9)

Outra possibilidade que tem vindo a ser estudada é relativa aos veículos /excipientes dos fármacos. Novas formulações têm sido propostas para o uso de fármacos tradicionais. Os **lipossomas** têm sido estudados, como meio ideal para fazer chegar os princípios activos anti-leishmania ao interior das células parasitadas; estudos demonstram uma eficácia muito superior dos antimoniais encapsulados quando comparado com o fármaco na forma livre. (3, 22)

Não nos devemos esquecer da importância da resposta imunitária na recuperação da doença; por este motivo têm sido realizados diferentes ensaios de imunoterapia, de forma a potenciar ou regular a resposta imunitária, com ou sem associação a outros fármacos com actividade anti-leishmania. Tem-se usado imunossuppressores (corticoides), imuno-estimuladores (péptidos bacterianos) e imunomoduladores específicos (citoquinas). (3)

O ***Coriolus versicolor*** (Corpet®), é um produto natural que funciona como um imuno-nutriente, ou seja, um nutriente específico que estimula o sistema imunitário a produzir células com funções imunitárias. Estes nutrientes são cada vez mais usados para modificar uma resposta inflamatória ou imunitária.

Este produto resulta da cultura de um cogumelo, *Coriolus versicolor*, cuja elevada tolerância e benefícios provados para a sobrevivência e qualidade de vida, o transformam num grande aliado do sistema imunitário. O uso de cogumelos para o tratamento de cancro e de determinadas infecções é uma prática comum na medicina Asiática.

A suplementação com *Coriolus versicolor* tem sido utilizada em pequenos animais desde 1999, no Reino Unido, e em cavalos

desde o início do ano 2000, sendo que em pequenos animais tem sido aplicada, especialmente, em casos de:

- fadiga devido à idade: com o intuito de reforçar o funcionamento do sistema imunitário;
- pré e pós-cirurgia: de forma a auxiliar e acelerar o processo de recuperação do animal;
- problemas virais: para procurar limitar a fadiga provoca por certos vírus, como por exemplo o da Leucemia felina (FeLV) e para ajudar a recuperar o equilíbrio do sistema imunitário;

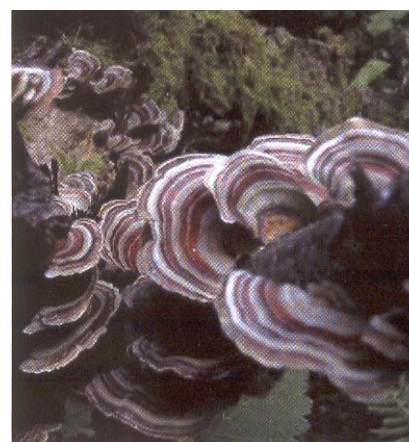


Figura 9: Cogumelo *Coriolus Vesicolor*.(5)

- quimioterapia e em cuidados paliativos no cancro: para reforçar o estado imunitário dos animais que se encontra debilitado nestas situações;

As propriedades imunoterapêuticas da nutrição com *Coriolus versicolor* são devidas à acção de:

- proteoglicanos PSK e PSP, que potenciam a acção imunitária, aumentando a actividade das células NK e das células T (CD3 e CD26);
- enzimas que previnem o stress oxidativo através da acção da lacase e da superóxido dismutase e induzem a desintoxicação por acção da actividade da peroxidase e do citocromo P-450;
- metabolitos que desempenham um importante papel na função imunitária e mostram actividade fibrinolítica, como as lectinas, terpenóides, metais quelantes.

O uso deste produto como suplemento, no tratamento da Leishmaniose, é baseado em estudos que demonstram que o seu conteúdo em proteoglicanos (especialmente o PSK e o PSP) leva à estimulação das células dendríticas e especialmente leva a uma mudança de uma resposta do tipo Th2 para Th1 (resposta do tipo celular) ocorrendo um aumento do INF $\gamma$ , da actividade das NK. O *Coriolus versicolor* tem demonstrado ser um imunomodulador eficaz em doenças que provoquem um desequilíbrio no balanceamento entre a resposta do tipo Th2 e a do tipo Th1.

O esquema de suplementação é composto essencialmente por duas fases:

- Fase de carga – na qual o produto é administrado em grandes quantidades, durante 15 a 30 dias o que permite a absorção do produto;
- Fase de manutenção – durante um período de 45 dias, com dosagem de cerca de metade do período anterior. Dependendo da situação clínica, o esquema de suplementação para manutenção, pode manter-se por seis meses a um ano. (5) (Quadro 2 – anexo1)



**Coriolus versicolor**

Figura 10: Embalagem de Corpet®. (5)

A suplementação com *Coriolus versicolor* não é um substituto para o tratamento médico, mas sim um produto de nutrição complementar para o equilíbrio do normal funcionamento do sistema imunitário do animal.

O **Levamisol** é um fármaco primariamente com actividade contra Nematodes mas tem sido usado como imunoestimulante, em doses inferiores à terapêutica. Este efeito foi demonstrado em modelos murinos infectados com *L. enriettii* e em humanos acometidos por *L. tropica*, tendo sido observada a diminuição da severidade das lesões e das alterações causadas pelo parasita. Não há relato de imunomodulação do Levamisol em cães com Leishmaniose visceral, mas acredita-se que o uso constante deste fármaco possa ser benéfico durante a fase de manutenção do tratamento, contribuindo para a diminuição do número e severidade das recaídas, que por ventura possam acontecer ao paciente. (6)

O **Infermun®** é um composto de células inactivas de *Propionibacterium acnes* e de lipopolissacáridos de células de *E.coli* e tratando-se de um imunomodulador, pode ser usado como suplemento no tratamento da Leishmaniose, para estimular o sistema imunitário.

O uso de **Vitamina C** em animais com Leishmaniose tem sido estudado, com vista à redução do pH urinário e consequente a uma diminuição da produção de urólitos de xantina pelos pacientes, um dos possíveis efeitos colaterais associados ao uso constante do Alopurinol. (6)

## **CONTROLO**

A possibilidade do controlo da Leishmaniose canina está relacionada com o controlo da Leishmaniose humana. A maioria das tentativas de controlo implicam programas de luta que incluam medidas contra os vectores e os reservatórios e medidas de protecção para os hospedeiros definitivos. (3)

### **Controlo do vector**

Para controlar o vector, são normalmente usados insecticidas de acção residual (malatión, lindano). Pulverizar a casa com insecticidas tem demonstrado algum grau de protecção contra os flebótomos, de acordo com diferentes estudos.

Os flebótomos têm maior actividade nas primeiras horas do dia e ao anoitecer. Durante a noite, o uso de redes protectoras pode dar um certo grau de protecção. Num estudo realizado demonstrou-se que pessoas que usavam redes protectoras tinham menos 70% de hipóteses de ser infectadas com Leishmaniose, quando comparadas com pessoas que não usavam redes. Noutro estudo, foram utilizadas redes tratadas com piretróides, que mostraram que um grau de protecção maior, diminuindo o número de picadas do mosquito. (7)

Outra possibilidade é a luta ecológica, mediante desflorestação e reflorestação com espécies desfavoráveis para o crescimento de flebótomos. (3)

### **“Luta” contra os reservatórios**

Pretende-se reduzir as fontes de parasitas, mas para isso é necessário a identificação de reservatórios silvestres (raposas e ratos), reservatórios peri-domésticos (cães abandonados/vadios) e cães domésticos. É, no entanto, difícil identificar e eliminar todos os reservatórios silvestres e peri-domésticos. No caso dos cães domésticos a actuação é diferente. Como já foi referido, no Brasil e na China também, uma das medidas de controlo passa pela eutanásia dos animais seropositivos, o que é, particularmente na Europa, muito difícil de aplicar. (4,6)

Estudos sobre os programas de eliminação de cães seropositivos mostram que estes programas têm menor relevância técnico-científica que outras medidas propostas para o programa de controlo, quer pela falta de relação espacial entre a incidência da Leishmaniose visceral humana e a seroprevalência canina, quer pela pouca eficiência da medida quando comparada ao controlo do vector. (6)

Outra alternativa para a prevenção desta doença é a aplicação de insecticidas ou repelentes no cão, de forma a diminuir o número de picadas de insecto e portanto a incidência da infecção, mas esta estratégia implica uma aplicação regular do produto, pois o efeito do produto é curto. Estudos têm demonstrado que

a aplicação de coleiras com deltametrina (Scalibor®) reduzem até 90% da proporção de flebótomos, reduzindo assim o risco de serem infectados. Outros produtos que têm vindo a ser estudados são: soluções tópicas de permetrina, combinações de imidaclopride e permetrina em spot-on.

Manter o cão dentro de casa durante a noite, desde o por do sol até uma hora após a nascer do sol, é também uma medida preventiva a aplicar. (3,4,7)

Tem sido difícil encontrar um programa eficaz de controlo contra a Leishmaniose. Os principais factores relacionados com este insucesso são: a falta de padronização dos métodos diagnóstico da infecção humana e canina; a discordância entre estudos de avaliação do impacto da eliminação dos cães seropositivos na prevalência da infecção humana; a demonstração de que outros reservatórios podem ser fonte de infecção de *L. chagasi/ infantum*; e a escassez de estudos sobre o impacto das acções dirigidas contra os vectores. (6)

É no desenvolvimento de vacinas anti-leishmaniose que se encontra o futuro para a prevenção da Leishmaniose. Existem inúmeros estudos feitos para diferentes tipos de antigénios, os quais apresentam muitas vezes resultados contraditórios. (1)

A prevenção da Leishmaniose canina pode vir a reduzir a prevalência da Leishmaniose humana nas zonas endémicas. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina contra a Leishmaniose é uma tarefa difícil. (1,7)

Neste sentido é importante encontrar uma vacina que seja capaz de induzir uma resposta do tipo celular Th1; produzir imunidade que previna a doença e a transmissão do agente; que seja eficiente contra as diferentes fases do parasita; que tenha baixo custo, que seja estável e de longa duração. As vacinas devem actuar bloqueando a transmissão do parasita e prevenindo a doença. Não basta que doença seja evitada, pois há animais assintomáticos que podem ser reservatórios para a transmissão da doença. (4,37)

#### Vacinas mortas – Killed Leishmania

Vacinas mortas ou atenuadas são vacinas em que o antigénio é inactivado através do calor ou através de meios químicos, impossibilitando a capacidade de se multiplicar no hospedeiro. (12)

Uma vacina composta por promastigotas de *Leishmania braziliensis* tratados com mertiolato e BCG foi usada nas fases I (estudo a nível laboratorial com um número pequeno de animais – 20 a 80 -, com o intuito de avaliar a segurança da vacina) e II (estudo realizado num maior número de animais – 20 a 300) dos testes clínicos em infecções de *L. chagasi* em cães no Brasil. Em 90% dos cães a vacina induziu uma resposta linfoproliferativa significativa aos antigénios da Leishmania; 26 meses após a imunização foi demonstrada a ausência de parasitas em necrópsia. No entanto, durante a fase III (estudo de campo com grande número de animais – 300 a 3000) dos testes clínicos a vacina não protegeu os cães contra a Leishmania. (1,11)

Esta discrepância de resultados pode estar relacionada com o baixo número de animais usados nas experiências comparado com o grande número de animais usado nos estudos de campo. (1,6)

Outro estudo no Irão demonstrou que, após a imunização com *Leishmania major* envolvida em hidróxido de alumínio e misturada com BCG, houve uma diminuição da incidência de Leishmaniose com uma taxa de eficácia de 69.3%. (29)

#### Vacinas de fracções purificadas da *Leishmania*

Este tipo de vacinas é feito através de polissacarídeos purificados pertencentes ao parasita. No entanto, uma das grandes limitações deste tipo de vacinas é a sua incapacidade de activar as células Th. (12)

De entre diversos testes feitos com este tipo de vacinas, um teste realizado com uma preparação de promastigotas de *Leishmania infantum* semi-purificada e liofilizada induziu uma resposta humoral nos cães vacinados. Estes anticorpos neutralizaram a multiplicação de *Leishmania infantum in vitro*, mas não foram capazes de bloquear completamente a infecção por promastigotas de *Leishmania major in vivo*. Esta mesma preparação, usada noutro teste, mostrou que no primeiro ano a taxa de infecção e de sinais de doença eram superiores nos animais vacinados, quando comparados com os cães não vacinados do controlo. Estes resultados podem ser justificados pelo facto da resistência à *Leishmania* estar associada a uma resposta do tipo celular e não do tipo humoral. (1)

Uma outra vacina foi testada no Brasil com um ligando fucose manose (FML), um complexo glicoproteico purificado de promastigotas de *Leishmania donovani*. Esta vacina demonstrou eficácia em dois estudos realizados em zonas endémicas. No primeiro estudo, 97% dos cães ficaram seropositivos para a FML e 100% deles com a reacção intradérmica positiva ao antígeno lisado de *Leishmania donovani*, sete meses após a vacinação. Dois anos após, 92% dos animais apresentavam protecção. Num outro estudo, 100% dos animais ficaram seropositivos a FML e apresentaram reacção intradérmica ao antígeno lisado de *Leishmania donovani*. Os autores concluíram que a vacina induzia um efeito significativo e duradouro protegendo contra a Leishmaniose. Além disso, estudos preliminares indicam que os cães vacinados apresentam bloqueio da transmissão, pela inibição da adesão das formas promastigotas de *Leishmania donovani* e *Leishmania chagasi* no intestino do flebótomo *Lutzomyia longipalpis*. (37)

Numa comparação dos anticorpos dos animais vacinados com os de animais naturalmente infectados, mostrou-se que a IgG1 estava associada à infecção natural enquanto que a IgG2 estava associada com a vacina de FML. Num outro estudo feito com esta vacina, foi observada a ausência de sintomas e de *Leishmanias* no sangue, na pele e nos gânglios linfáticos, em cães vacinados. Estes resultados demonstram o efeito protector da FML contra *Leishmania*, no entanto, um número maior de animais devem ser investigados. (1)

A vacina-FML (Leishmune®) é a primeira vacina a ser licenciada contra a Leishmaniose canina no Brasil e tem mostrado resultados promissores tanto ao nível de protecção como duração longa da imunidade. No entanto, ainda não é possível avaliar o impacto desta vacina na prevalência da Leishmaniose humana.

É necessário que esta passe a ser rotineira na profilaxia nas zonas endémicas. Esta vacina aprovada no Brasil é indicada para cães a partir de quatro meses de idade, em três doses, com intervalos de 21 dias e revacinação anual. (37)

#### Vacinas de antígenos recombinantes de *Leishmania*

Na teoria, o gene que codifica qualquer proteína imunogénica pode ser clonado e exprimir essa proteína noutras células (bactérias, leveduras, mamíferos), utilizando a tecnologia do DNA recombinante, podendo ser posteriormente utilizadas em vacinas. (12)

Um dos primeiros antígenos recombinantes a ser usado, foi a proteína de membrana gp63. A gp63 funciona como um receptor de ligação aos macrófagos e demonstrou-se que parasitas mutantes que não apresentem esta proteína não são patogénicos, por isso tem sido estudada como antígeno. Apesar de ser considerada uma boa candidata à vacina devido às suas características, os diferentes estudos têm conduzido a resultados variáveis. A resposta das células T à gp63 é inconstante, contudo sempre que, uma resposta é detectada esta é do tipo Th1. (1,13)

Outro dos testes realizados envolveu uma vacina feita com uma mistura de três antígenos recombinantes de *Leishmania* (TSA, LelF e LmST11) e dois adjuvantes diferentes MPL-SE® e AdjuPrime®. Os cães após imunização foram infectados com promastigotas de *Leishmania chagasi*. Uma resposta com predominância de IgG2 foi medida nos cães que foram imunizados com os antígenos recombinantes e MPL-SE®. Os animais imunizados com os antígenos recombinantes e AdjuPrime® obtiveram uma resposta mista de IgG2 e IgG1. No entanto o efeito protector da vacina não foi avaliado. (10)

Noutro estudo de Leishmaniose canina foi avaliada a resposta humoral e celular de cães infectados naturalmente contra duas proteinases de cisteína recombinantes de *Leishmania infantum*, a rCPA e rCPB. Os resultados mostraram que o nível de anticorpos era baixo em relação rCPA tanto nos cães sintomáticos como nos assintomáticos. No entanto os níveis de anticorpos reactivos ao rCPB foram altos (sendo a maioria da classe IgG2) nos cães assintomáticos em comparação com os sintomáticos. A habilidade deste antígeno provocar uma resposta do tipo Th1 em animais assintomáticos leva a que seja usado em novos testes para verificar a sua capacidade protectora como vacina. (1, 29)

Outro antígeno, um receptor para a activação da C cinase (LACK), que é expresso tanto nos promastigotas como nos amastigotas, foi usado com sucesso na protecção da infecção em ratos, especialmente quando administrado juntamente com a IL-12. (7)

Este antígeno foi recombinado com uma vacina vírica (rVV) e 17 meses após a infecção com *Leishmania infantum* 60% dos cães vacinados ficaram protegidos e não apresentaram sinais da doença. Estes cães imunizados apresentaram respostas imunes caracterizadas por uma resposta inicial mista de Th1 e Th2, tendo depois progredido para uma resposta Th1. Já os cães do grupo de controlo (não imunizados) apresentaram uma resposta do tipo Th2. (1)

Em suma, ainda está por descobrir uma vacina efectiva e que possa ser usada. A maioria dos antígenos

induz protecção significativa nos cães, no entanto, estes animais apenas foram sujeitos a um único teste. Nos estudos efectuados no campo obtiveram-se resultados pouco promissores, não se encontraram grandes diferenças entre os cães vacinados e os cães de controlo. (1)

Muitos problemas precisam de ser resolvidos até se encontrar a vacina “perfeita”.

É necessário descobrir qual o antigénio/antigénios que são capazes de desencadear uma resposta protectora no animal, não nos esquecendo que cada hospedeiro tem a sua própria componente genética, logo pode ter uma resposta diferente. É possível que seja necessária uma vacina com diferentes antigénios para garantir uma resposta efectiva em toda a população. No entanto, produzir uma vacina com polipeptídeos e com glicolipídios em larga escala pode revelar-se difícil. (13)

É necessário que a vacina seja segura e que não venha exacerbar a doença ou causar reacções patológicas; não nos podemos esquecer que a vacina não deve causar a doença por falha na inactivação do parasita e que pessoas imunodeprimidas possam contrair a doença mesmo com organismos atenuados. (37)

É importante encontrar um adjuvante correcto. Trabalhos recentes indicam que é necessária uma apresentação de antigénio especializada (através das células dendríticas ou células de Langerhans na pele), para que seja inicializada uma resposta das células T. (13) Têm sido usados adjuvantes como bactérias ou outras partículas, que podem carregar genes para TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  e que podem vir a potenciar a resposta imunitária. Em alternativa podem ser usadas citoquinas como adjuvantes “naturais”, pois estas vão promover uma resposta imunitária do tipo Th1. A IL-12 é essencial para induzir e manter este tipo de resposta numa vacina contra a *Leishmania*. (1,10,13)

## CONCLUSÃO

Por se tratar de uma doença de difícil diagnóstico, tanto clínico como laboratorial, a Leishmaniose canina tem-se tomado num grande desafio dentro da prática da Medicina Veterinária.

Tem vindo a ser demonstrado que nem todos os animais infectados desenvolvem a doença, implicando que a Leishmaniose visceral canina deva ser considerada resultado de uma disfunção imunológica, resultante do parasitismo do sistema mononuclear fagocitário pela *Leishmania*, produzindo diferentes graus de sinais clínicos e imunológicos, que podem ser reversíveis com tratamento específico ou espontaneamente em indivíduos imunologicamente competentes.

A maioria dos cães infectados não desenvolve a doença e mantém-se assintomático. Estes apresentam uma resposta imune do tipo celular contra a *Leishmania* e usualmente são seronegativos ou positivos fracos. Pelo contrário, cães doentes mostram uma resposta imune do tipo humoral mas uma resposta celular muito fraca.

Demonstrou-se também que a prevalência da Leishmaniose é muito maior que a tradicionalmente pensada. Em áreas endémicas é possível que mais de 50% dos cães venham a ficar infectados.

Cães infectados, mesmo quando assintomáticos, constituem um risco para a população, pois servem como reservatório da *Leishmania*, sendo assim uma fonte de infecção para o flebótomo. Os cães tratados, por não existir nenhum fármaco que consiga eliminar totalmente o parasita do organismo, são também considerados possíveis transmissores da doença.

A eutanásia dos animais que são seropositivos não é um método eficaz no controlo da doença. Deve-se, principalmente, procurar combater o vector, de forma a evitar a infecção.

A procura de novos tratamentos tem trazido diferentes alternativas como a miltefosina, que foi desenvolvida inicialmente como um quimioterápico anti-neoplásico, ou como o *Coriolus versicolor*, que é um produto usado como imunomodulador, estimulando o sistema imunitário do animal.

A vacina contra a Leishmaniose começa a ser uma realidade no Brasil, apesar de ainda ser cedo para avaliar a sua eficácia. Simultaneamente, continuam a ser efectuados estudos para o desenvolvimento de uma vacina efectiva contra a Leishmaniose.

Com todas as dificuldades encontradas na tentativa de se controlar a Leishmaniose visceral canina, parece que, de uma forma geral, a forma mais eficaz é a união de medidas preventivas exercidas nos cães e medidas ambientais para controlar o vector. Ao mesmo tempo deve procurar realizar-se um melhor diagnóstico de forma a identificar correctamente os animais infectados e os animais doentes e encontrar uma vacina eficaz, capaz de controlar a expansão da doença canina e humana.

## CASO CLÍNICO

A Zara é uma cadela da raça Labrador Retriever com 4 anos de idade, com 25,3 kg. Apresentou-se á consulta com um problema dermatológico, no dia 6 de Novembro 2008.

A cadela encontra-se vacinada contra as principais doenças infecciosas caninas (adenovírus, parvovírus, esgana, parainfluenza e raiva). Não se encontra desparasitada correctamente nem interna nem externamente. Não tem antecedentes médicos nem cirúrgicos de relevância registado nos ficheiros clínicos. Não toma nenhuma medicação actualmente. A alimentação é feita com comida caseira (restos de restaurante) e ração comercial. O dono vive na Lousã numa casa com quintal onde a cadela costuma estar juntamente com outros cães.

Os donos queixam-se que a cadela tem sido “atacada” por moscas, provocando feridas nas orelhas e que há cerca de três dias começou a coçar muito os olhos até fazer ferida.

Ao realizar-se o exame físico obtiveram-se os seguintes resultados:

A atitude do animal em estação, decúbito e em movimento não apresentou alterações. O animal não é agressivo, o seu estado mental no consultório é alerta e o seu temperamento é equilibrado. O animal apresenta uma condição corporal de 2 (numa escala de 1 a 5) e pesa actualmente 25.3 kg. Os movimentos respiratórios são regulares, ritmados, com uma profundidade normal, costo-abdominal de relação 1 para 1,3, com 24 r.p.m.. O pulso é de 104 p.p.m. regular, ritmado, bilateral, simétrico, sincrónico e forte. A temperatura registada foi de 40,2 °C (tónus anal

adequado e, no termómetro, não se verifica a presença de muco, sangue ou formas parasitárias macroscópicas). As mucosas oral e anal estão rosadas, húmidas e brilhantes com o TCR de 1.5 segundos; a mucosa ocular encontra-se congestionada e inflamada. O grau de desidratação é inferior a 5%. Os gânglios linfáticos submandibulares, pré escapulares e poplíteos são palpáveis e de dimensões normais. Os restantes gânglios não são palpáveis. A palpação abdominal e auscultação cardio-pulmonar não apresentam alterações.

Foi possível observar feridas na base e na ponta das orelhas do animal; os dois ouvidos apresentavam espessamento e inflamação das paredes; observou-se edema palpebral e a conjuntiva ocular encontrava-se inflamada. O animal apresentava-se com onicogribose. (Figura 1 - Anexo 3)

Realizaram-se exames complementares cujos resultados se encontram a seguir discriminados:

- Speed Leish Teste rápido: Positivo
- Hemograma: Anemia (Anexo 4)
- Bioquímica: Hiperproteinémia por hiperglobinémia (Anexo 4)
- Teste serológico de pesquisa de anticorpos anti-leishmania: positivo à diluição 1/240

A Zara tem Leishmaniose complicada com otite bilateral e conjuntivite bilateral.

O tratamento realizado/prescrito foi:

- Para a conjuntivite:  
Limpeza ocular com solução oftálmica;
- Para a otite:  
Limpeza auricular com Omniotic® e aplicação de Conofite forte®. Limpeza auricular durante 10 dias mínimo.
- Limpeza das feridas das orelhas com água oxigenada e aplicação Conofite forte® e Omnimatrix®. Limpeza das feridas da pele com água oxigenada e aplicação Conofite forte® e Omnimatrix®. Em casa deve fazer limpeza das feridas BID, durante 10 dias mínimo;
- Para a Leishmaniose:  
Início da terapia com Corpet® 4 comprimidos SID durante 15 dias; depois passa a 2 comp. SID 45 dias;  
Alopurinol 1 comp. BID;  
Recomendação do uso de uma coleira Scalibor®.

### **Acompanhamento do caso**

11/11/2008

Veio para controlo.

As feridas encontram-se em recuperação, sinais de melhora na conjuntivite, no entanto, em relação à otite as paredes ainda se encontram espessadas, apesar de menos inflamadas.

Administração de Infermun® 2ml, com o objectivo de estimular o sistema imunitário.

13/11/2008

Veio para controlo.

Administração da segunda dose de Infermun® 2ml.

17/11/2008

Veio para controlo.

Pode observar-se uma boa recuperação das lesões.

Administração da terceira dose de Infermun® 2ml.

24/11/2008

Apresenta se muito bem disposta; tem comido bem.

Realizamos limpeza das feridas; ainda apresenta algum espessamento da parede do ouvido, no entanto está a recuperar.

5/12/2008

Boa evolução das feridas.

Continuação do tratamento local; durante o mês de Dezembro não vão poder vir cá, sendo que só em Janeiro poderá vir a controlo.

16/01/2009

A Zara veio para controlo serológico.

A Zara apresenta ainda algumas crostas e feridas (Figura 2 – Anexo 3) no entanto tem andado bem disposta, tem comido bem. A Zara aumentou de peso, passando para 27 kg.

A análise serológica foi positiva à diluição de 1/160, tendo assim diminuído a máxima diluição em que ocorre a aglutinação, isto é, diminuiu o título de anticorpos anti-leishmania em apenas dois meses de tratamento.

A Zara vai continuar com o tratamento com Alopurinol e com o Corpet® para tentar baixar o nível de anticorpos anti-leishmania, devendo vir a controlo daqui a 3 meses.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Barbiéri, CL., (2006) "Immunology of canine leishmaniasis", **Parasite immunology**, 28, 329-337;
- (2) Cabral M., *et al*, (1992) "Demonstration of Leishmania specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs", **Parasite Immunology**, 14, 531-539;
- (3) Campillo M. & Vázquez F., (2002) "Parasitosis sistémicas – Leishmanioses canina" in McGraw Hill, **Parasitología Veterinaria** 3ª edição, capítulo 36, 652-665;
- (4) Cardoso L. (2007), "Current knowledge on the parasitology and prevention of canine leishmaniasis" **Bayer HealthCare, Your Partner in Dermatology**. 7-15;
- (5) Corpet News vol1 (2006), vol 2 (2007), vol 3 (2008) – **Mycology Research Laboratories**;
- (6) Da Silva S, (2007) "Avaliação Clínica e Laboratorial de cães naturalmente infectados, submetidos a um protocolo terapêutico em Clínica Veterinária de Belo Horizonte", **Tese de Mestrado Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**, 32-60;
- (7) Davies CR *et al*, (2003) "Leishmaniasis: new approaches to disease control", **BMJ - British Medical Journal**, vol.326, 377-382;
- (8) Ferrer Lluís (2002), "Canine Leishmaniasis: Evaluation of the Immunocompromised patient", **WSAVA 2002 Congress Proceedings**, in <http://www.wsava.org/>;
- (9) Ferrer Lluís (2002), "Leishmaniasis canina: actualización en diagnóstico y terapéutica" **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias – X Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia**, supl.118,20-21;
- (10) Fujiwara RT, *et al* (2005) "Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmST11) potencial vaccine candidates for visceral leishmaniasis", **Vet. Res.** 36, 827-838;
- (11) Gerano O, *et al* (1996) "Phase III randomized double blind clinical trials of a vaccine against canine visceral Leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil", **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 91-166;
- (12) Goldsby, RA, *et al* (2002) "O sistema imune na saúde e na doença" in **Kuby – Imunologia**, 4ª Ed, 449-465;
- (13) Handman E., (2001), "Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development" **Clinical Microbiology Reviews**, 229-243;
- (14) <http://1mkturin.wordpress.com/2008/11/18/learning-about-protists/>
- (15) <http://labutes.vilabol.uol.com.br/calazar.htm>;
- (16) <http://lucianodinizvet.blogspot.com/2007/07/leishmaniose-canina.html>
- (17) <http://www.amicinet.com.br/noticias/?acao=1m&tp=2&id=409>
- (18) <http://www.bandarravet.com/LeishmanioseseePartel.htm>
- (19) <http://www.biologyreference.com/Mo-Nu/Nonspecific-Defense.html>
- (20) <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=315&sid=32&tpl=printerview>
- (21) <http://www.ivis.org/>;
- (22) <http://www.leishmaniasis.info/>;

- (23) <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/tutorials/leishmaniasis/htm/index.htm>;
- (24) <http://www.vet.uga.edu/vpp/NSEP/Brazil2002/leishmania/Port/Leish04.htm>
- (25) José, FF, (2001) “Avaliação do poder sensibilizante de reacção de Montenegro”, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol 34 Nov/Dez, 537-542;
- (26) Killick-Kendrick, R (1999), “The biology and control of phlebotomine sand flies”, **Clin.Dermatol.** 17, 279-289;
- (27) López, Juan Rejas (1997) “Processos parasitários – Leishmaniose” in **Manual de Dermatologia de animais de companhia Universidade de Leon**, 77-79;
- (28) Mendez S., *et al* (2001) “The potency and durability of DNA - and Protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge”, **The Journal of Immunology**, 166, 5122-5128;
- (29) Mohebbi M, *et al* (2004) “Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral Leishmaniasis in Meshkin Shahr district, I.R. Iran”, **Vaccine** 22: 4097-4100;
- (30) Moreno J e Alvar J (2002), “Canine leishmaniasis: epidemiological risk and experimental model”, **Trends Parasitol.**, 18, 399-405;
- (31) Nakhae A, *et al* (2004) “Humoral and cellular immune responses against Type 1 cysteine proteinase of *Leishmanis infantum* are higher in asymptomatic than symptomatic dogs select from naturally infected populations”, **Vet Parasitol.**, 119: 107-123;
- (32) Nelson & Couto, (2006) “Infecções Protozoárias Polissistémicas” in Mosby-Elsevier, **Medicina Interna de Pequenos Animais**, 3ª Ed, capítulo 104, 1265-1266;
- (33) Neta, AVC. *et al*, (2006), “Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina”, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol 58, nº4, 480-488;
- (34) **ON-Leish**: <http://www.onleish.org/>;
- (35) Otranto D. *et al*, (2004) “Rapid Immunochromatographic Test for Serodiagnosis of Canine Leishmaniasis”, **Journal of Clinical Microbiology**, June 2004, 2769-2770;
- (36) Ribeiro R., *et al* (2008) “Reduced Tissue Parasitic Load and Infectivity to Sand Flies in Dogs Naturally Infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* Following Treatment with a Liposome Formulation of Meglumine Antimoniate”, **Antimicrobial agents and chemotherapy**, vol 57, nº 7, 2534-2572;
- (37) Ribeiro VM, (2004), “Imunização contra Leishmaniose visceral canina, implicações em saúde pública”, **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral**, in <http://www.spmv.org.br/conpavet2004/>;
- (38) Solano Gallego, (2001), “*Leishmania infantum* and dog: immunological and epidemiological studies about infection and disease”, **Tese Doctoral Facultat de Veterinària – Universitat Autònoma de Barcelona**, 1-27;

- (39) Uzonna J., *et al* (2004), "Vaccination with Phosphoglycan-deficient *Leishmania major* protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response", **The Journal of Immunology**, 172, 3793-3797;
- (40) Vouldoukis I., *et al*, (1996) "Canine Visceral Leishmaniasis: Successful Chemotherapy Induces Macrophage Antileishmanial Activity via the L-arginine Nitric Oxide Pathway", **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 253-256;
- (41) WHO/OMS: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Quadros

Forma da doença	“Old World”	“New World”
<b>Cutânea</b>	<i>L. aethiopica</i> complexo - <i>L. aethiopica</i> <i>L. major</i> complexo - <i>L. major</i> <i>L. tropica</i> complexo - <i>L. trópica</i> <sup>d</sup> - <i>L. Killicki</i>	<i>L. mexicana</i> complexo - <i>L. mexicana</i> - <i>L. venezuelensis</i> - <i>L. amazonensis</i> - <i>L. pifanoi</i> - <i>L. gamhami</i> <i>L. braziliensis</i> complexo - <i>L. braziliensis</i> <sup>a</sup> - <i>L. panamensis</i> <sup>a</sup> - <i>L. guyanensis</i> <sup>a</sup> - <i>L. peruviana</i> - <i>L. lainsoni</i> <sup>b</sup>
<b>Visceral</b>	<i>L. donovani</i> complexo - <i>L. donovani</i> - <i>L. infantum</i> <sup>c</sup>	- <i>L. chagasi</i> <sup>a,c,e</sup>

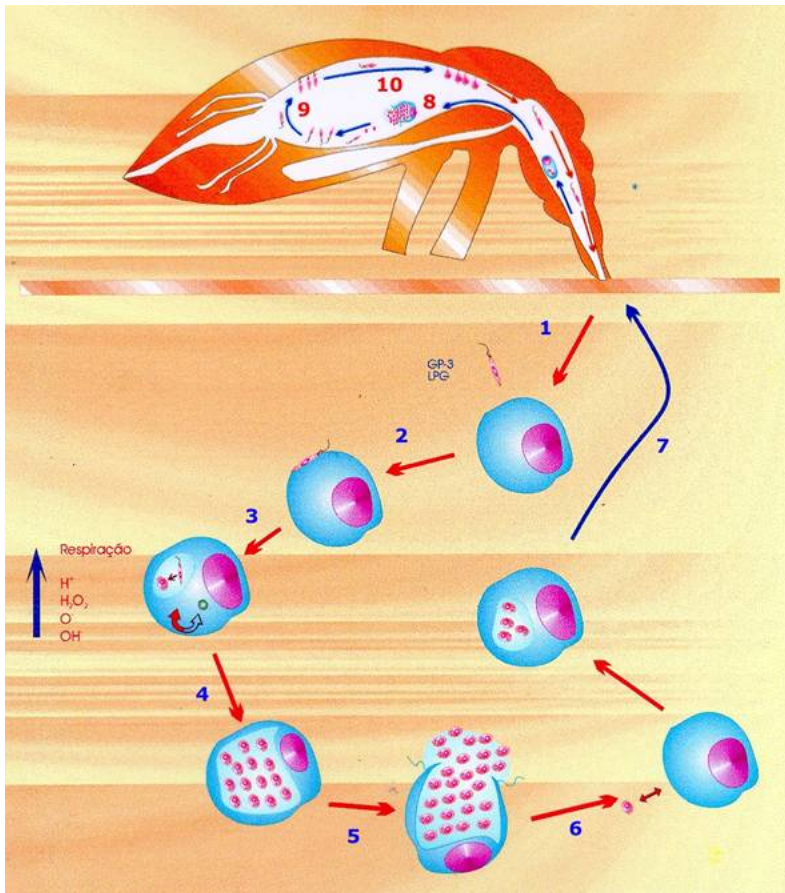
Quadro 1 – Formas clínicas da leishmaniose humana

- a – pode causar também leishmaniose mucocutânea
- b – não se encontra atribuído definitivamente
- c – principal agente da leishmaniose canina
- d – poucos casos descritos em cães
- e – *L. chagasi* = *L. infantum*

	Dose inicial	Dose de Manutenção I	Dose de Manutenção II
<b>Cães e Gatos</b>	<b>Dia 1 a 15</b>	<b>Dia 16 a 60</b>	<b>Dia 61 a 120</b>
Pequenos <10 kg	2 comp/dia	1 comp/dia	1 comp/dia
Médios 10 a 30 kg	4 comp/dia	2 comp/dia	1 comp/dia
Grandes >30 kg	6 comp/dia	3 comp/dia	1 comp/dia

Quadro 2 – Um esquema de Suplementação possível do *Coriolus versicolor* (Corpet®).

## ANEXO 2 – Esquema



Legenda:

1. Durante a alimentação, a fêmea do flebotomo introduz formas promastigotas metacíclicas no local da picada;
2. Os promastigotas são interiorizadas por macrófagos teciduais;
3. Os promastigotas transformam-se em amastigotas;
4. Inicia-se o processo de reprodução no interior do vacúolo;
5. Ocorre a ruptura do macrófago e liberação dos parasitas no interstício;
6. Os parasitas são fagocitados por novos macrófagos;
7. Os macrófagos parasitados podem ser ingeridos pela fêmea do flebotomo durante a alimentação;
8. No estômago do insecto, macrófago rompe-se libertando os amastigotas. Ocorre a transformação dos amastigotas em promastigotas, que se dividem por divisão binária;
9. Promastigotas migram para o intestino e colonizam as regiões do píloro e íleo;
10. Promastigotas se aderem ao epitélio e se reproduzem. Transformação em promastigota e migração para o estômago, e em seguida para a faringe do insecto (promastigotas metacíclicas);

Esquema 1: Ciclo biológico da Leishmania .

ANEXO 3 – Imagens do caso



Figura 1: Zara no dia da primeira consulta.



Figura 2: Zara na consulta em Janeiro, mostrando claras melhoras.

## ANEXO 4 – Análises da Zara

### Hemograma

Análise	Resultado	Valores normais
WBC	7.11x10 <sup>9</sup> /l	C: 6-17; F: 5.5-19.5
LYM	0.79 x10 <sup>9</sup> /l	C: 1-4.8; F: 1.5-7
MID	0.23 x10 <sup>9</sup> /l	C: 0.18-1.3; F: 0-0.8
GRA	6.08 x10 <sup>9</sup> /l	C: 3-12; F: 2.5-14
LYM%	11.1%	C: 12-30; F: 20-55
MI%	3.2%	C: 3-10; F: 1-4
GRA%	85.6%	C: 62-87; F: 35-80
RBC	3.25x10 <sup>12</sup>	C: 5.5-8.5; F: 5.5-10
HGB	7.4 g/dl	C: 12-18; F: 8-15
HCT	20.06%	C: 37-55; F: 24-45
MCV	62fl	C: 0-77; F: 39-55
MCH	22.7 pg	C: 19.5-24.5; F: 12.5-17.5
MCHC	36.8 g/dl	C: 31-34; F: 30-36
RDWc	22.9%	
PLT	—	C: 200-500; F: 300-800
PCT	—	
MPV	—	
PDWc	—	

### Bioquímica

Análise	Resultado	Valores normais
ALB	2.2 g/dl	C:2.5-4.4; F:2.2-4.4
ALP	10 U/l	C: 20-150; F:10-90
ALT	28 U/l	C:10-118; F: 20-100
AMY	1236 U/dl	C:200-1200; F:300-1100
TBIL	0.2 mg/dl	C: 0.1-0.6; F:0.1-0.6
BUN	12 mg/dl	C:7-25; F: 10-30
Ca <sup>++</sup>	8.9 mg/dl	C: 8.6-11.8; F: 8-11.8
PHOS	5.1 mg/dl	C: 2.9-6.6; F:3.4-8.5
CREATININA	0.6 mg/dl	C: 0.3-1.4; F: 0.3-2.1
GLU	86 mg/dl	C: 60-110; F:70-150
Na <sup>++</sup>	143 mmol/l	C: 138-160; F: 142-164
K <sup>+</sup>	4.5 mmol/l	C: 3.7-5.8; F: 3.7-5.8
PT	9.4 g/dl	C: 5.4-8.2; F: 5.4-8.2
CLOB	7.1 g/dl	C: 2.3-5.2; F: 1.5-5.7
HEMÓLISE	0	
LIPÉMIA	0	
ICTERÍCIA	0	
RELAÇÃO ALB/GLO	0.31	C:0.6-1.1; F:0.8-1.3