



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DOENÇAS PARASITÁRIAS DO CÃO TRANSMITIDAS POR INSECTOS CULICÍDEOS  
E PSICODÍDEOS NO FUNCHAL E EM BARCELONA

BÁRBARA ANDREIA JARDIM GOMES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professor Doutor Virgílio da Silva Almeida

Professora Doutora Isabel Maria Soares  
Pereira da Fonseca Sampaio

Professor Doutor José Augusto Farraia e  
Silva Meireles

Dr. Duarte Bruno Castro Correia

ORIENTADOR

Dr. Duarte Bruno Castro Correia

CO-ORIENTADORA

Professora Doutora Isabel Maria  
Soares da Fonseca Sampaio

2009

LISBOA





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DOENÇAS PARASITÁRIAS DO CÃO TRANSMITIDAS POR INSECTOS CULICÍDEOS  
E PSICODÍDEOS NO FUNCHAL E EM BARCELONA

BÁRBARA ANDREIA JARDIM GOMES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professor Doutor Virgílio da Silva Almeida

Professora Doutora Isabel Maria Soares  
Pereira da Fonseca Sampaio

Professor Doutor José Augusto Farraia e  
Silva Meireles

Dr. Duarte Bruno Castro Correia

ORIENTADOR

Dr. Duarte Bruno Castro Correia

CO-ORIENTADORA

Professora Doutora Isabel Maria  
Soares da Fonseca Sampaio

2009

LISBOA

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Doutor Duarte Bruno Castro Correia, Director clínico da Sociedade Protectora dos Animais Domésticos, pela oportunidade de estágio concedida e pela transmissão do seu conhecimento e experiência profissional.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Isabel Maria Pereira da Fonseca, Professora Associada da Faculdade de Medicina Veterinária, pela sua disponibilidade, ajuda e apoio na realização desta dissertação.

Aos meus pais Carlos Humberto Gomes e Maria Olga Gomes, à minha irmã Laura Gomes, por todo o apoio, carinho, amor e paciência constante, durante toda a minha vida e essencialmente durante o meu estágio curricular e na escrita desta dissertação.

Às minhas amigas Rita Pontes, Isabel Grou e ao meu amigo Luís Paulo, pelo ombro amigo durante os momentos mais desafiantes deste trabalho.

A todos os meus colegas de curso e, em especial à Rita Pontes, Luís Paulino, Dora Mancha, Ana Gomes, pelo apoio, paciência e carinho incondicional proporcionados nos bons e maus momentos de trabalho e lazer durante todos estes anos.

A todos os Médicos Veterinários e Funcionários da Clínica Sociedade Protectora dos Animais Domésticos e do Hospital Clínic Veterinari de Barcelona, pelo óptimo ambiente de trabalho que me proporcionaram e por tudo que me ensinaram.

Aos meus colegas estagiários, pela amizade e por todas as experiências vividas durante o estágio.

À Professora Doutora Marta Santa Ana Gouveia, da Direcção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural do Funchal, pela formidável disponibilidade na cedência de material, fundamental para a escrita da dissertação.



# DOENÇAS PARASITÁRIAS DO CÃO TRANSMITIDAS POR INSECTOS CULICÍDEOS E PSICODÍDEOS

## Resumo

As doenças mais importantes, transmitidas por insectos culicídeos e psicodídeos, que afectam a espécie canina, são a dirofilariose e leishmaniose. A dirofilariose é uma doença crónica causada pelo nemátode da espécie *Dirofilaria immitis*, que existe predominantemente em zonas de climas tropicais e subtropicais. Os insectos do género *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*, são responsáveis pela transmissão da forma infectante L<sub>3</sub>. A leishmaniose é uma doença zoonótica, causada pelo protozoário da espécie *Leishmania infantum*, que existe predominantemente na Bacia do Mediterrâneo. Em Portugal e Espanha, os vectores responsáveis pela transmissão das formas infectantes, os promastigotas metacíclicas, ao hospedeiro canídeo, são as espécies *Phlebotomus perniciosus* e o *P. ariasi*.

No presente trabalho, foram realizados dois estudos retrospectivos, um sobre a dirofilariose na Ilha da Madeira e que englobou 29 cães e outro sobre leishmaniose em Barcelona, que incluiu 20 animais. Relativamente ao estudo da dirofilariose, verificou-se que a maioria dos animais eram assintomáticos. O diagnóstico etiológico foi realizado com base no exame físico, pela detecção de microfíliarias e filárias adultas, através da técnica de Knott modificada e de ELISA. A terapêutica etiológica englobou uma terapêutica adulticida com melarsomina, seguida de uma terapêutica microfilaricida com lactonas macrocíclicas. No estudo retrospectivo da leishmaniose, observou-se animais com sinais clínicos muito variáveis, no entanto, a maioria dos cães apresentam letargia, linfadenomegália, lesões dermatológicas. As alterações laboratoriais mais observadas foram uma anemia não regenerativa e uma hiperproteinémia com hiperglobulinémia e hipoalbuminémia. O diagnóstico etiológico foi realizado com base no exame físico, histórica clínica, por cELISA e RT-PCR. Diferentes fármacos foram utilizados no tratamento, contudo o antimoniato de meglumina e o alopurinol, são os mais utilizados.

**Palavras-chaves:** *Dirofilaria*, *Leishmania*, culicídeos, psicodídeos, cão; Madeira, Barcelona



# CANINE PARASITOLOGIC DISEASES TRANSMITTED BY CULICIDAE AND PSYCHODIDAE INSECTS

## Abstract

Dirofilariosis and leishmaniosis are the main diseases transmitted by Culicidae and Psychodidae insect that affect canines. Dirofilariosis is a chronic disease, caused by *Dirofilaria immitis* that is prevalent in areas with a tropical or subtropical environment. Insects from the genus *Culex*, *Anopheles* and *Aedes* are responsible for transmitting the L<sub>3</sub> infective form. Leishmaniosis is a zoonotic disease prevalent in the Mediterranean basin, caused by *Leishmania infantum*. In Portugal and Spain, the main vectors, responsible for transmitting the infected form, the metacyclic promastigotes, are *Phlebotomus perniciosus* and *P. ariasi*.

In the purpose of the chosen theme, two retrospective studies were conducted: one on dirofilariosis including 29 dogs at Madeira Island and another on leishmaniosis in 20 dogs at Barcelona. In the dirofilariosis study, most animals were asymptomatic. The diagnosis was made by physical examination, detection of the microfilaria and adult heartworm, with the modified Knott technique and by ELISA. The treatment was completed with an adulticide therapy with melarsomine and a microfilaricide therapy with macrocyclic lactones. In the leishmaniosis retrospective study, many clinic signs were observed, but most dogs presented lethargy, lymphadenomegaly and dermatologic lesions. The major laboratory changes observed were a non regenerative anemia and a hyperproteinemia with hyperglobulinemia and hypoalbuminemia. Diagnosis was made through clinical history, physical examination and parasitological exams, by cELISA and RT-PCR. There are many different drugs which can be used for treatment, but the most used in this study were meglumine antimoniate and allopurinol.

**Keywords:** *Dirofilaria*, *Leishmania*, *Culicidae*, *Psychodidae*, dog, Madeira, Barcelona





## Índice Geral

I.	INTRODUÇÃO .....	1
II.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
	DIROFILARIOSE .....	4
1.	Etiologia e epidemiologia .....	4
2.	Ciclo Biológico .....	8
3.	Fisiopatologia .....	9
4.	Interacção <i>D. immitis/Wolbachia</i> .....	13
5.	Quadro clínico .....	15
6.	Diagnóstico .....	16
6.1.	Detecção de microfilárias .....	17
6.2.	Métodos serológicos .....	19
6.3.	Radiografia .....	22
6.4.	Electrocardiografia .....	23
6.5.	Ecocardiografia .....	23
6.6.	Patologia clínica .....	24
7.	Terapêutica .....	25
7.1.	Terapêutica adulticida .....	25
7.2.	Terapêutica cirúrgica .....	31
7.3.	Terapêutica microfilaricida .....	32
7.4.	Terapêutica suplementar .....	34
8.	Prognóstico .....	36
9.	Profilaxia .....	37
9.1.	Dietilcarbamazina .....	37
9.2.	Lactonas macrocíclicas .....	38
9.3.	Ivermectina .....	38
9.4.	Milbemicina oxima .....	39
9.5.	Moxidectina .....	40
9.6.	Selamectina .....	41
9.7.	Avermectinas e Collies .....	41
	LEISHMANIOSE .....	42
1.	Etiologia e epidemiologia .....	42
2.	Ciclo biológico .....	44
3.	Fisiopatologia .....	48
4.	Quadro Clínico .....	55
4.1.	Período inicial .....	55
4.2.	Período patente .....	56
4.3.	Período final .....	57
5.	Lesões .....	58
6.	Diagnóstico .....	63
6.1.	Diagnóstico Laboratorial .....	63
6.2.	Métodos de diagnóstico Parasitológico .....	65
6.3.	Diagnóstico Serológico .....	67
6.4.	Diagnóstico Molecular .....	71
7.	Terapêutica .....	72
7.1.	Compostos antimoniais pentavalentes .....	73
7.2.	Análogos de Purinas .....	74
7.3.	Antibióticos .....	75
7.4.	Diamidinas .....	76
7.5.	Miltefosina .....	76
7.6.	Outros fármacos .....	76
8.	Prognóstico .....	77



9.	Profilaxia.....	77
10.	Importância em Saúde Pública .....	79
III.	Estudo de doenças parasitárias do cão transmitidas por insectos culicídeos e psicodídeos, observadas na Clínica SPAD – Sociedade Protectora dos Animais Domésticos do Funchal, Ilha da Madeira e, no Hospital Escolar da Universidade Autónoma de Barcelona, Espanha.....	81
1.	Materiais e métodos .....	81
1.1.	Dirofilariose .....	81
1.2.	Leishmaniose.....	81
2.	Resultados .....	82
2.1.	Caracterização da amostra em estudo na Ilha da Madeira .....	82
2.2.	Caracterização da amostra em estudo em Barcelona .....	85
2.3.	Estudo clínico.....	87
3.	Discussão .....	96
3.2.	Conclusão .....	108
IV.	BIBLIOGRAFIA .....	110

### Índice de Figuras

Figura 1.	Aspecto de Demodicose.....	1
Figura 2.	Aspecto de uma sarna notoédrica num coelho.....	1
Figura 3.	Aspecto de síndrome de Horner num cão .....	1
Figura 4.	Hemivértebra num cachorro.....	2
Figura 5.	Megaesófago numa cadela .....	2
Figura 6.	Hérnia diafragmática num cachorro.....	2
Figura 7.	Pormenor de uma colonopéxia num gato após um prolapso rectal.....	3
Figura 8.	Aspecto de um otopneumoma num cão .....	3
Figura 9.	Aspecto de uma prótese dentária num cão.....	3
Figura 10.	<i>Culex pipiens</i> .....	7
Figura 11.	<i>Culex pipiens</i> .....	7
Figura 12.	Ciclo biológico de <i>Dirofilaria immitis</i> no cão .....	8
Figura 13.	Microfilária de <i>D. immitis</i> corada pela fosfatase ácida .....	18
Figura 14.	Aspecto da remoção cirúrgica de filárias num Rotweiler com síndrome de veia cava usando um fórceps .....	32
Figura 15.	<i>Phebotomus perniciosus</i> ♀ .....	45
Figura 16.	Ciclo biológico da leishmaniose canina.....	47
Figura 17.	Formas promastigotas da espécie de Leishmania .....	48
Figura 18.	Formas amastigotas no interior de um macrófago, de uma citologia de uma punção de linfonodo (1000x) .....	48
Figura 19.	Apresentação de fracções antigénicas do parasita pelo MHC-II de macrófagos aos linfócitos T.....	52
Figura 20.	Conjuntivite num cão com uveíte .....	57
Figura 21.	Epistaxis unilateral .....	57
Figura 22.	Onicogribose num cão com LCan Animal com caquécia, atrofia muscular .....	58
Figura 23.	Animal com caquécia, atrofia muscular .....	58
Figura 24.	Proteinograma electroforético do soro de um cão saudável (A) e com leishmaniose canina (B) .....	65



## Índice de Tabelas

Tabela 1. Características morfológicas de <i>D. immitis</i> e <i>A. reconditum</i> .....	18
Tabela 2. <i>Kits</i> comerciais de testes de antígeno .....	20
Tabela 3. Classificação da dirofilariose.....	26
Tabela 4. Principais espécies de <i>Leishmania</i> .....	44
Tabela 5. Factores suspeitos de influenciar o curso da infecção de <i>Leishmania infantum</i> em cães .....	50
Tabela 6. Caracterização da amostra em estudo de acordo com a raça.....	84
Tabela 7. Distribuição da amostra estudada por concelhos e freguesias da Ilha da Madeira...	84
Tabela 8. Caracterização da amostra em estudo de acordo com a raça.....	86
Tabela 9. Distribuição da amostra em estudo por regiões da Comunidade Autónoma de Espanha.....	86
Tabela 10. Resultados dos hemogramas de 5 animais.....	88
Tabela 11. Sinais oftalmológicos presentes em quatro animais com LCan .....	91
Tabela 12. Resultados do hemograma de 14 animais e o seu respectivo estudo estatístico.....	92
Tabela 13. Alterações dos parâmetros bioquímicos dos animais com leishmaniose canina....	92
Tabela 14. Distribuição das doenças concomitantes presentes nos 12 animais com LCan.....	94

## Índice de Gráficos

Gráfico 1. Identificação do sexo da amostra em estudo, de acordo com a frequência relativa	82
Gráfico 2. Frequência relativa (%) da idade dos animais.....	83
Gráfico 3. Identificação do sexo da amostra em estudo em Barcelona, com base na frequência relativa .....	85
Gráfico 4. Frequência relativa (%) da idade dos cães com leishmaniose.....	85
Gráfico 5. Frequência absoluta e relativa dos sinais clínicos observados em 18 animais do presente estudo na Ilha da Madeira .....	87
Gráfico 6. Distribuição da amostra com base na frequência relativa pelos métodos de diagnóstico.....	89
Gráfico 7. Frequência absoluta e relativa dos sinais clínicos observados nos 20 animais estudados .....	90
Gráfico 8. Distribuição da amostra por método de diagnóstico, com base na frequência relativa .....	94
Gráfico 9. Distribuição da amostra de acordo com a percentagem de resultados obtidos pela técnica de cELISA .....	94



## Índice de abreviaturas e de símbolos

> – Maior

≥ – Maior ou igual

< – Menor

≤ – Menor ou igual

% – Percentagem

°C – Graus Celsius

μL – Microlitro

dL – Decilitro

μm – Micrómetro

Ac – Anticorpo

AD – Aglutinação directa

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

Ag – Antigénio

ALT – Alanina aminotransferase

APC – Células apresentadoras de antigénios

AST – Aspartato aminotransferase

AT III – Anti-trombina III

BID – A cada doze horas

CAMV – Centro de atendimento médico-veterinário

CF – Citometria de Fluxo

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CIC – Complexos imunes circulantes

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

CIE – Contraimunolectroforese

CK – Creatina quinase

COX – Cicloxigenases

CSMF – Células do sistema mononuclear fagocitário

DEC – Dietilcarbamazina

DiSA – Extracto de antigénio de *D. immitis*

ECG – Electrocardiograma

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*

eNOS – Óxido nítrico sintase do tipo endotelial

FAS – Fosfatase Alcalina Sérica

FAST – *Fast Agglutination Screening Test*





FDA – *Food Drug Administration*  
GP – Glicoproteína  
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média  
HE – Hematoxilina Eosina  
HT – Hematócrito  
ICAM-1 – Moléculas de adesão intracelular  
ID – Imunodifusão  
IFI – Imunofluorescência Indirecta  
IFNB – *Interferon- $\gamma$  cytophatic effect Inhibition Bioassay*  
IFN- $\gamma$  – Interferão- $\gamma$   
Ig – Imunoglobulina  
IL – Interleucina  
IM – Intramuscular  
iNOS – Óxido nítrico sintetase induzido do óxido nítrico  
IV – Intravenoso  
kg – Quilograma  
LCan – Leishmaniose canina  
LDU – Leishman Donovan Units  
LOs – Lipoxigenases  
LPA – *Lymphocyte Proliferation Assay*  
LPG – Lipofosfoglicano  
LSA – *Leishmania infantum Soluble Antigen*  
LST – *Leishmanin Skin Test*  
LTs – Leucotrienos  
mg – Miligrama  
MHC-II – Classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade  
mL – Mililitro  
NK – Células natural killer  
NO – Óxido nítrico  
PCR – Reacção em cadeia da polimerase  
PECAM-1 – Moléculas de adesão endotelial plaquetária  
PEG – Polietilenoglicol  
P-gp – P-glicoproteínas  
PGs – Prostaglandinas  
PIO – Pressão Intra-ocular



PMN – Polimorfonuclear  
PO – Por via oral  
PVC – Pressão venosa central  
RLO – Radicais livre de oxigénio  
SC – Subcutâneo  
SID – A cada vinte e quatro horas  
TAC – Tempo de activação da coagulação  
TGF- $\beta$  – Factor Beta de Transformação do Crescimento  
Th1 – Linfócitos T-helper do tipo 1  
Th2 – Linfócitos T-helper do tipo 2  
TNF- $\alpha$  – Factor de Necrose Tumoral Alfa  
TP – Tempo de protrombina  
TPT – Tempo parcial da tromboplastina  
TXs – Tromboxanos  
VCAM-1 – Moléculas de adesão da célula vascular  
VCM – Volume Corpuscular Médio  
WB – *Western Blottin*  
WSP – Proteínas de superfície de *Wolbachia*



## I. INTRODUÇÃO

O estágio curricular foi desenvolvido na Clínica SPAD - Sociedade Protectora dos Animais Domésticos do Funchal entre o dia 28 de Setembro e o dia 28 de Novembro, com uma carga horária de 360 horas, e no Hospital Clínic Veterinari (HCV) de Barcelona entre o dia 8 de Dezembro e o dia 28 de Fevereiro com uma carga horária de 420 horas.

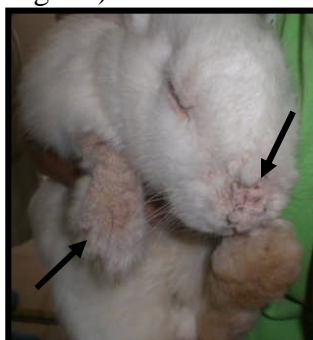
As actividades variaram consoante o país e a cidade, na Clínica SPAD consistiram na observação e participação nos serviços de Medicina Interna, Imagiologia, Cirurgia e Internamentos. No HCV consistiram na observação e participação nos serviços de Medicina Interna, Imagiologia, Cirurgia, Anestesiologia, Oftalmologia, Dermatologia, Neurologia, Exóticos e Internamentos.

No serviço de Medicina Interna no HCV foi permitido iniciar as consultas externas, em que a autora realizou a história pregressa e o exame físico, seguidos por uma posterior discussão com Médico Veterinário, sobre os diagnósticos diferenciais, exames complementares a realizar, possíveis diagnósticos e terapêutica a instituir. Foi também possível estar presente em consultas de oftalmologia, neurologia, dermatologia e de exóticos, com discussão dos possíveis diagnósticos diferenciais, exames complementares, diagnóstico e a terapêutica a ser instituída. No serviço de Medicina Interna da Clínica SPAD, foi exequível assistir às consultas externas, com posterior discussão dos respectivos casos. Entre as várias consultas assistidas, destaca-se algumas de maior interesse por parte da autora, como um meningioma cervical numa cadela, torção gástrica num cão, anemia hemolítica imunomediada num cão, Demodicose num cão (Figura 1), sarna notoédrica num coelho (Figura 2), prolapso vaginal numa cadela, síndrome de Horner num cão (Figura 3), megaesofago numa cadela, poliradiculoneurite num cão, entre muitas outras.

**Figura 1.** Aspecto de Demodicose (fotografia original)



**Figura 2.** Aspecto de uma sarna notoédrica num coelho (fotografia original)



**Figura 3.** Aspecto de síndrome de Horner num cão (fotografia original)

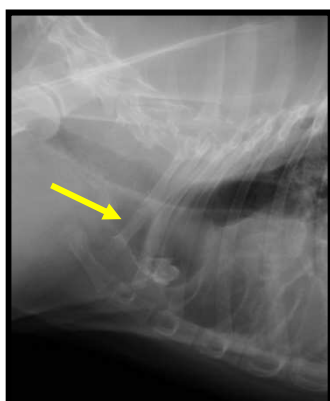


No serviço de Imagiologia, a autora teve oportunidade de participar na realização, revelação, interpretação e discussão das radiografias efectuadas. Também foi possível assistir, interpretar e discutir com o Médico Veterinário do serviço, algumas mielografias, ressonâncias magnéticas, ultrasonografias abdominais, oculares e cardíacas. Entre os vários exames radiográficos observados, é de salientar algum dos casos mais interessantes, como uma hemivertebra num cachorro (Figura 4), um megaesófago numa cadela (Figura 5), e uma hérnia diafragmática num cachorro (Figura 6).

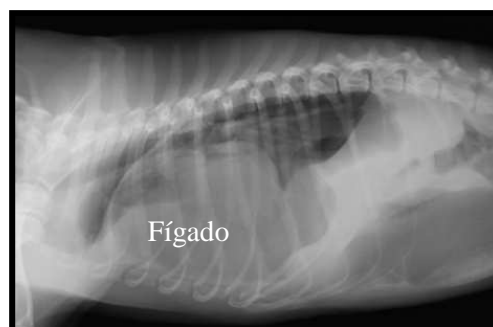
**Figura 4.** Hemivértebra num cachorro (fotografia original)



**Figura 5.** Megaesófago numa cadela (fotografia original)



**Figura 6.** Hérnia diafragmática num cachorro (fotografia original)

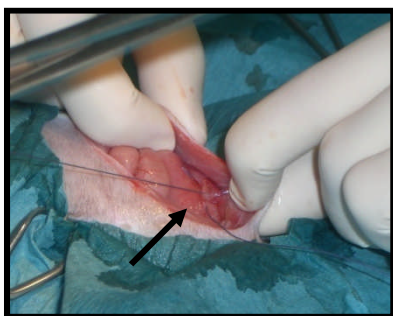


Em cirurgia, as actividades realizadas consistiram na preparação dos animais no pré-operatório, no apoio ao cirurgião durante a cirurgia, na monitorização da anestesia e do pós-operatório. No HCV, a monitorização da anestesia foi efectuada enquanto a autora esteve no serviço de anestesiologia. Foi também possível participar nas consultas de seguimento, remoção de suturas e realização de vários tipos de pensos.

As cirurgias mais frequentemente observadas foram orquiectomias em cães e em gatos como também, ovariectomias em cadelas e gatas. Algumas das cirurgias menos frequentes, mas de grande interesse para a autora foram, uma colonopexia a um gato com prolapso do cólon após um prolapso rectal (Figura 7), amputação da cauda de um cão, hemilaminectomias para a resolução de hérnias toracolombares em três cães, cirurgia às cataratas em três cães, ressecção da cabeça do fémur num cão, laparotomia exploratória numa cadela, resolução

cirúrgica de um otohematoma num cão (Figura 8), uma prótese dentária num cão (Figura 9), entre muitas outras.

**Figura 7.** Pormenor de uma colonopéxia num gato após um prolapso rectal (fotografia original)



**Figura 8.** Aspecto de um otohematoma num cão (fotografia original)



**Figura 9.** Aspecto de uma prótese dentária num cão (fotografia original)



No serviço de Internamentos, as tarefas consistiram em turnos de doze horas a vinte e quatro horas, em que participou na monitorização dos animais, administração das medicações instituídas, alimentação dos animais e passeio dos animais. A monitorização consistiu num exame físico completo, com medição da temperatura rectal, frequência cardíaca e respiratória, pulso, observação da coloração das mucosas e quando necessário medição da pressão sanguínea.

Ao longo de todo o estágio curricular, a autora teve a oportunidade de colocar cateteres endovenosos, fazer recolha de sangue para posterior análise hematológica e bioquímica, realização de testes rápidos de diagnóstico, consultas de aconselhamento no acto de adopção de animais e preenchimento das fichas de microchip. Através de um microscópio, pôde observar algumas das citologias auriculares e cutâneas, sedimento urinário, esfregaços de sangue periférico para verificar a presença de microfilárias, entre outras.

Adicionalmente, a autora participou em seminários semanais com duração aproximadamente de duas horas, no HCV, sobre vários temas, como a diferenciação entre doença renal e insuficiência renal, hipertiroidismo, hipotiroidismo, coagulação, entre outros. É de salientar que também participou na discussão diária de casos clínicos e de artigos, quando presente no serviço de oftalmologia.



## **O motivo de escolha do tema**

As doenças parasitárias cujos agentes etiológicos são transmitidos por insectos culicídeos e psicodídeos, são doenças que ao longo dos anos têm vindo a ocorrer com maior incidência, conseqüentemente à distribuição dos vectores, à sua capacidade de dispersão, à existência de hospedeiros infectados, às condições climáticas e à movimentação dos animais entre zonas endémicas e não endémicas.

A dirofilariose é a principal doença no cão transmitida pelos insectos culicídeos, do género *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*. No entanto apenas a espécie *Dirofilaria immitis*, é de grande interesse e apresenta um carácter patogénico para canídeos e felídeos, sendo por vezes zoonótico. O primeiro caso de dirofilariose em humanos nos Estados Unidos da América foi observado num cadáver de uma mulher em 1941 (Nissen, 2006). Este mesmo autor menciona que os casos de dirofilariose pulmonar em humanos, ocorrem predominantemente em regiões onde a prevalência da dirofilariose canina é superior a 40%. Os insectos culicídeos, são também os vectores responsáveis pela transmissão de *Plasmodium*, de *Flavivirus* e dos nemátodes *Wuchereria* e *Brugia*, em humanos (Ferasin & Knight, 2005).

A Leishmaniose, é uma doença crónica e zoonótica causada por um protozoário difásico do género *Leishmania*, transmitida por insectos psicodídeos do género *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Lima-Netto, 2001; Ferasin & Knight, 2005; Roze, 2005).

A dirofilariose e a leishmaniose foram as doenças mais frequentemente observadas e diagnosticadas durante o estágio curricular. A sua importância deve-se à sua grande prevalência nos locais onde a autora realizou o estágio curricular e pelo facto de serem duas doenças de grande importância na Medicina Veterinária e também em Saúde Pública.

A presente dissertação está dividida em duas partes, em que a primeira consta de uma revisão bibliográfica sobre a dirofilariose e leishmaniose caninas e, a segunda parte, sobre um estudo retrospectivo de todos os casos causados pelos agentes etiológicos das doenças referidas.

## **II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **DIROFILARIOSE**

#### **1. Etiologia e epidemiologia**

A dirofilariose, também conhecida como doença do verme do coração, é uma infecção causada pelo nemátode *Dirofilaria immitis* (Ferasin & Knight, 2005). Este parasita pertence ao Filo NEMATELMINTHES, Classe NEMATODA, Ordem Spirurida, Superfamília Filarioidea e Família Onchercidae (Urquhart, Armour, Duncan & Jennings, 1996).

A dirofilariose apresenta-se distribuída pelas zonas de climas tropicais e subtropicais, da América do Norte e Sul, África, México, Austrália, Japão, sul da Europa (Espanha, Itália, Portugal, sul da França e Grécia) e no sul da Ásia (Ferasin & Knight, 2005; Atkins, 2005; Genchi, Rinaldi, Cascone, Mortarino & Gringoli, 2005; Genchi, Rinaldi, Mortarino, Genchi, & Cringoli, 2009). Conforme a *American Heartworm Society* (AHS, 2005), *D. immitis* é endémica nos Estados Unidos da América em pelo menos 48 estados, incluindo no Hawaii, Porto rico, Ilhas Virgens e Guam. Rochette (2003) menciona no seu trabalho, um estudo realizado por Guerrero entre 1986 a 1990, demonstrando a prevalência de cães infectados em França (1%), Itália (6% a 25%), Espanha (2%) e, em Portugal (14%).

Em Portugal, mais propriamente nas regiões do sul, a prevalência varia entre 12% a 17%, sendo mais elevada na Ilha da Madeira, onde 30% dos cães testados foram positivos às microfilárias de *D. immitis* (Genchi et al., 2005). Num trabalho desenvolvido por Pereira da Fonseca, Carvalho, Madeira de Carvalho & Carvalho-Varela (1991) sobre a prevalência da dirofilariose na população canina portuguesa, evidenciou-se uma percentagem maior de animais parasitados por microfilárias na Ilha da Madeira (30%), seguida do Ribatejo e Oeste (16,7%), Alentejo (16,5%) e Algarve (12%). Neste mesmo estudo, foi evidenciada uma prevalência bastante inferior, no norte e centro do país (entre Douro e Minho, Trás-os-Montes, Beira Litoral e Beira Interior). Segundo estes autores a temperatura necessária para o desenvolvimento do parasita no interior do mosquito pode explicar as menores prevalências no norte do país e as mais altas no sul do território continental.

O parasita localiza-se primeiramente nas artérias pulmonares dos cães e, apenas no lado direito do coração em circunstâncias pouco comuns, como numa síndrome da veia cava ou numa infecção maciça (Kienle & Kittleson, 1998). O cão doméstico é o hospedeiro natural, contudo, outras espécies também pode ser infectada por *Dirofilaria immitis*, incluindo o lobo, raposa, coiote, gato doméstico e selvagem, furão, rato, leão-marinho, guaxini e os humanos (Atkins, 2005). Muitas destas espécies são designadas como hospedeiros acidentais, pelo facto de os parasitas não sofrerem a maturação final necessária para completar o ciclo biológico (Ferasin & Knight, 2005).

A transmissão de *D. immitis* depende de três factores: (i) da presença do mosquito vector; (ii) da população canina e (iii) da temperatura ambiente. Segundo Genchi et al. (2009), a temperatura, a precipitação e a humidade relativa são os factores principais que determinam a abundância dos vectores. Nos climas tropicais e temperados, a temperatura ideal para o desenvolvimento do vector é de 25°C a 27°C. Num trabalho desenvolvido por aqueles autores evidenciou-se que a transmissão sazonal da dirofilariose na Europa, ocorre no Verão, entre

Junho e Setembro. Neste mesmo estudo, segundo várias estações meteorológicas, é o mês de Julho que apresenta a temperatura mais adequada para o desenvolvimento da dirofilariose.

Existem mais de 3000 espécies de mosquitos, conquanto, apenas 60 são capazes de transmitir *D. immitis* (Kienle & Kittleson, 1998). Estes insectos pertencem ao Filo ARTROPHODA, Classe INSECTA, Ordem Díptera, Subordem Nematocera e Família Culicidae. Nesta família existem cerca de 34 géneros, em que os mais importantes são, *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* (Urquhart et al., 1996). Destes géneros, Simón et al. (2007) menciona algumas das espécies competentes para transmitir *D. immitis*, como *Culex pipiens*, *Aedes albopictus*, *Anopheles maculipennis* e *Coquillettidia richiardii*. Segundo Labarthe, Serrão, Melo, Oliveira & Lourenço-de-Oliveira (1998), os mosquitos da espécie *Ae. taeniorhynchus*, *Ae. scapularis* and *Cx. quinquefasciatus*, são potenciais vectores naturais de *D. immitis*.

Estes mosquitos (Figura 10 e 11), são dípteros pequenos, com um comprimento de 2-10mm e com patas longas, com pouco tempo de vida e, com um raio de dispersão de cem metros do local de alimentação. No entanto, podem dispersar-se por longas distâncias através do vento (Urquhart et al., 1996). As fêmeas dos mosquitos do género *Anopheles*, depositam mais de 200 ovos em grupos na superfície da água, durante a noite. As espécies do género *Culex*, depositam ovos lado a lado de modo a formar uma “jangada”, que contém entre 100 a 300 ovos. Os mosquitos fêmeas do género *Culex*, depositam os ovos na terceira noite após eclosão. A maioria das espécies do género *Aedes*, depositam os seus ovos em substratos húmidos. As larvas eclodem quando o teor de água é favorável. Em alguns casos, os ovos podem ser viáveis até aos 3 anos. Os ovos são resistentes e toleram temperaturas superiores a 40°C como também, temperaturas muito baixas. As larvas de todas as espécies destes géneros são aquáticas e desenvolvem-se numa grande variedade de habitats, como em poças de água, nas extremidades de uma piscina, entre muitos outros. As larvas de mosquitos necessitam entre 3 a 20 dias para atingir o 4º estado. No último estado larvar, as larvas sofrem uma muda para uma pupa. As pupas geralmente ficam na superfície da água durante 7 dias e não se alimentam. Os mosquitos adultos emergem após o 7º dia do estado de pupa e reproduzem-se após 24 horas. As fêmeas necessitam de uma refeição de sangue para desenvolverem os ovários e os ovos. As fêmeas dos mosquitos vivem em média 2 a 3 semanas, enquanto o tempo médio de vida dos machos é mais reduzido (Wall & Shearer, 2001). Alguns mosquitos apresentam uma alimentação diurna (e.g. *Culex* sp.), enquanto outros preferem alimentar-se durante a tarde (e.g. *Aedes* sp.). As maiorias destes mosquitos alimentam-se em cães, excepto a espécie *Culex pipiens*, que para além do cão, alimenta-se também no gato (Kienle & Kittleson, 1998).

**Figura 10.** *Culex pipiens*  
(Adaptado de Vries, 2006)



**Figura 11.** *Culex pipiens* (Adaptado de Vries, 2006)



Existem actualmente cinco espécies de mosquitos na Ilha da Madeira, *Aedes aegypti*, *Culex hortensis maderensis*, *Culex pipiens* L., *Culex theileri*, *Culiseta longiareolata* e *Ochlerotatus eatoni* (Santa-Ana, Khadem & Capela, 2006; Almeida, Gonçalves, Novo, Sousa, Melim & Grácio, 2007). Num estudo recente realizado por Santa-Ana et al. (2006), foi comprovado a presença da larva de *D. immitis* nos túbulos de malphigi e na cabeça de *C. theileri*, indicando assim, esta espécie como um potencial vector natural na transmissão da dirofilariose na Ilha da Madeira (Santa-Ana et al., 2006).

Apesar da transmissão entre canídeos fazer-se através de um vector, já foram reportados casos em que a infecção surgiu sem a presença de um vector. Segundo Kienle & Kittleson (1998) está descrita a transmissão vertical pela via transplacentária, porém as microfilárias não têm capacidade para atingirem a maturação, mas são infectantes para os mosquitos, contribuindo para a continuação do ciclo.

Vários são os factores de risco que predispõem para a infecção por *D. immitis*. Existe uma diferença significativa entre os sexos, sendo o macho mais afectado. Kienle & Kittleson (1998) referem que o rácio entre macho-fêmea é de 2 para 4:1. Este fecho pode ser explicado pela sua maior exposição (cães vadios, de caça e de desporto) (Pereira da Fonseca et al., 1991). A infecção é comum em cães entre os 4 a 7 anos, mas em regiões endémicas, é possível observa-la em cães mais novos (Kienle & Kittleson, 1998). Os cães de grande porte e que vivem no exterior das habitações apresentam um risco acrescido em relação aos cães que vivem no interior (Calvert & Thomason, 2008). O tipo de pelagem e a raça não aparentam ter qualquer influência na infecção (Kienle & Kittleson, 1998). Segundo Pereira da Fonseca et al.

(1991) não há predisposição consoante o tipo de pelagem, pelo facto dos mosquitos escolherem áreas com pouco pêlo.

## 2. Ciclo Biológico

No ciclo biológico da dirofilariose (Figura 12), os mosquitos são os hospedeiros intermediários obrigatórios na transmissão de *D. immitis* mas apenas as fêmeas hematófagas são capazes de infectar os cães (Ware, 2007). No hospedeiro definitivo, as microfilárias são produzidas pelas fêmeas adultas e são libertas na corrente sanguínea. O mosquito infecta-se ao ingerir sangue de cães infectados, ou de outras espécies susceptíveis, que têm larvas imaturas ( $L_1$ ), na corrente sanguínea (Kienle & Kittleson, 1998).

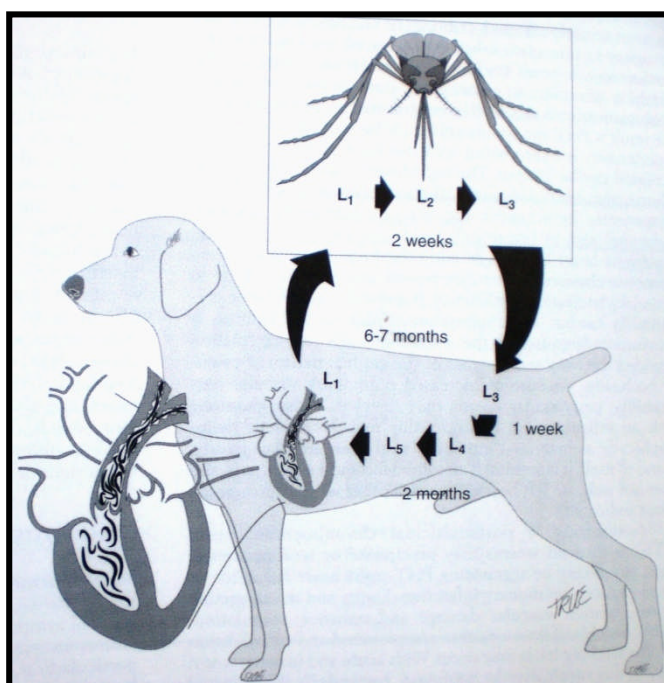
No mosquito, sofrem duas mudas ( $L_1$  para  $L_2$  e  $L_2$  para  $L_3$ ) no interior dos túbulos de Malpighi, num período de 8 a 17 dias (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005). Durante 2 a 3 dias a forma infectante  $L_3$ , migra pelo corpo do insecto até chegar à cabeça e, acumula-se nas suas peças bucais (Kienle & Kittleson, 1998). Mais tarde, durante a sua refeição de sangue, a  $L_3$  sai das peças bucais depositando-se na pele do hospedeiro (Kienle & Kittleson, 1998; Ferasin & Knight, 2005).

O tempo de maturação no interior do mosquito depende da temperatura ambiente, e varia entre 10 dias a 28°C

a 30 dias a 18°C. A larva não sofre muda quando as temperaturas são inferiores a 14°C. Existe uma relação linear entre a temperatura ambiental e o desenvolvimento larvar, sabendo-se que demoram 130 dias a desenvolver a 15°C e apenas 65 dias a 16°C e assim sucessivamente (Kienle & Kittleson, 1998).

Uma vez no interior do hospedeiro, migra pelos tecidos subcutâneos, musculares e adiposo, onde sofre duas mudas ( $L_3$  para  $L_4$  e de  $L_4$  para  $L_5$ ) (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005). A primeira muda ocorre logo após a infecção do hospedeiro, entre 1 a 12 dias, enquanto a muda final para  $L_5$ , ocorre entre 50 a 68 dias (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005). Estas

**Figura 12.** Ciclo biológico de *Dirofilaria immitis* no cão (Adaptado de Atkins, 2005)



**Legenda:** months: meses; weeks: semanas; week: semana

formas adultas imaturas, com 1 a 2 cm de comprimento, depressa entram no sistema vascular e através do fluxo sanguíneo, chegam à artéria pulmonar (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005). A distribuição das filárias na artéria pulmonar, depende do fluxo sanguíneo pulmonar e arterial. A maioria das filárias alojam-se nos ramos das artérias pulmonares dos lobos pulmonares caudais, por estes apresentarem maior fluxo sanguíneo (Kienle & Kittleson, 1998). Após 190 a 285 dias (cerca 6 meses no cão e 7 a 8 meses no gato) ou, 110 a 210 dias após chegarem à artéria pulmonar, atingem a maturidade sexual e produzem microfílarias ( $L_1$ ). Apresentam uma periodicidade sazonal e diurna, sendo maior o número de microfílarias, durante a tarde e no Verão (Atkins, 2005). Devido a discordâncias entre autores, a clássica descrição de periodicidade, não pode ser aplicada consistentemente a *D. immitis* (Kienle & Kittleson, 1998).

Na maioria das infecções experimentais, 40% a 70% das  $L_3$  atingem o estado adulto no cão e, apenas 5% a 10% no gato (Kienle & Kittleson, 1998). Consequentemente, a carga parasitária no gato é menor, variando entre uma a nove  $L_5$ , enquanto que o cão pode apresentar mais de 100 (Kienle & Kittleson, 1998; Ferasin & Knight, 2005).

As filárias adultas vivem entre 5 a 7 anos no cão e as microfílarias durante 30 meses (Atkins, 2005). Porém, no gato o tempo de vida é menor, podendo persistir durante 2 anos (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005).

### **3. Fisiopatologia**

A dirofilariose é a principal causa de hipertensão em regiões endémicas (Ware, 2007). A designação “doença do verme do coração” leva à sua má interpretação, porque as filárias adultas residem grande parte do seu tempo no sistema arterial pulmonar e, porque os cães só manifestam sinais de doença quando as artérias pulmonares e os pulmões estão lesionados (Atkins, 2005).

A presença dos nemátodes adultos nas artérias pulmonares, causam uma proliferação da íntima, com conseqüente constrição e oclusão dos vasos. No entanto, o bloqueio directo pelas  $L_5$  é uma possibilidade remota (Ferasin & Knight, 2005). A gravidade da lesão e as conseqüências clínicas, estão relacionadas com o número de filárias (que variam de 1 a 250), a duração da infecção e da interacção entre o hospedeiro e o parasita (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005). Contudo, apesar da gravidade da doença ser frequentemente associada à carga parasitária, a interacção hospedeiro-parasita é mais importante do que a carga parasitária, no desenvolvimento dos sinais clínicos (Ware, 2007).

As larvas localizam-se principalmente nas artérias dos lobos pulmonares caudais (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005). No entanto, em grandes infecções, ocasionalmente migram

para as artérias pulmonares principais, para o lado direito do coração e até mesmo para as veias pulmonares (Atkins, 2005).

As lesões que ocorrem nas artérias pulmonares são causadas pelas filárias, por acção de substâncias tóxicas, mecanismos imunológicos e trauma, originando uma proliferação das vilosidades da mioíntima, inflamação, hipertensão pulmonar, uma alteração na integridade vascular e, por último fibrose. Esta situação pode complicar-se com uma obstrução vascular e vasoconstricção causadas por um tromboembolismo de filárias mortas e dos seus produtos (Atkins, 2005).

Na dirofilariose a lesão característica, é uma proliferação das vilosidades da mioíntima. As alterações induzidas pelas filárias, têm início com uma inflamação do endotélio, seguida de uma distensão das junções intercelulares e, de um aumento da permeabilidade vascular, que leva à formação de um edema periarterial (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005; Ware, 2007).

A inflamação é regulada por eicosanóides, mediadores químicos que induzem ou suprimem a inflamação. A síntese de eicosanóides é mediada pelas cicloxigenases (COXs) e lipoxigenases (LOs). Vários são os tipos de células que participam na síntese de eicosanóides, enquanto muitas outras células, representam o alvo, para a acção destes mediadores. A actividade do COX-2, leva à produção de prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), enquanto 5-LO está associado à produção de leucotrienos (LTs). Cada uma destas moléculas tem diferentes efeitos reguladores no processo da inflamação. Por outro lado, os leucócitos interagem com moléculas de células de adesão endotelial, como a molécula de adesão da célula vascular (VCAM-1), molécula 1 de adesão intracelular (ICAM-1), moléculas de adesão da célula endotelial plaquetar (PECAM-1), selectinas e outros (Morchón, Rodríguez-Barbero, Velasco, López-Belmonte & Simón, 2008).

Num estudo experimental, Morchón et al. (2008) demonstraram que um extracto de antigénio de *D. immitis* adulta (DiSA), induz uma modificação numa cultura de células endoteliais humanas. A DiSA activa a expressão do COX-2, PGE<sub>2</sub> e das enzimas responsáveis pela síntese de óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintetase do tipo endotelial (eNOS) e do tipo macrófágico (iNOS), pelas células endoteliais 24 horas após estimulação. COX-2 activa o percurso do ácido araquidónico e produz PGE<sub>2</sub>. Este eicosanóide está implicado na regulação da função vascular, reparação tecidual, processo inflamatório e lesão pulmonar, enquanto que o NO actua em diferentes mecanismos, incluindo na regulação autócrina da pressão vascular. Neste estudo, também foi demonstrado, uma diminuição da permeabilidade vascular, devido à acção dos dextranos, entre as 12 horas e 24 horas após a estimulação com o antigénio DiSA. Apesar de contraditório, Morchón et al., (2008) e Simón et al., (2008) relacionaram a PGE<sub>2</sub>

com o decréscimo da permeabilidade pelos dextrans nas células endoteliais dos vasos pulmonares, indicando uma possibilidade, de que o aumento da expressão da PGE<sub>2</sub> neste caso, possa contribuir para a diminuição da permeabilidade do endotélio das células culturais. A lesão endotelial promove a activação e o recrutamento de células inflamatórias activadas, dos leucócitos e das plaquetas. A migração destas células e a produção de factores tróficos, levam a que as células do músculo liso migrem e proliferem da túnica média para a íntima (Atkins, 2005; Ware, 2007). Os factores tróficos (*e.g.* factores de crescimento derivados das plaquetas), estimulam a multiplicação das células musculares, que por sua vez, produzem protuberâncias na túnica íntima da artéria pulmonar (Kienle & Kittleson, 1998; Ferasin & Knight, 2005). A migração destas células sob a acção de factores de tróficos, induzem uma ligeira proliferação, com acumulação de colagénio e eventualmente fibrose (Atkins, 2005).

A proliferação vilosa da túnica íntima ocorre entre três a quatro semanas após a chegada das filárias adultas. As vilosidades, reduzem o lúmen das artérias pulmonares mais pequenas e, originam uma lesão proliferativa mais extensa (Ware, 2007). O edema das células endoteliais e a alteração das junções intercelulares, aumentam a permeabilidade vascular do pulmão (Atkins, 2005). As larvas mortas, incitam uma resposta intensa do hospedeiro, complicando a doença pulmonar. Os fragmentos das larvas e de trombos, estimulam uma reacção que leva a formação de fibrose. Todo este processo pode promover uma trombose, bem como uma reacção tecidual perivascular (Ware, 2007). O edema periarterial formado, pode ser grave, ao ponto de ser visível radiograficamente (Atkins 2005; Ware, 2007). Além desta alteração, também é possível observar-se um infiltrado inflamatório e um aumento da densidade intersticial e alveolar (Atkins, 2005).

Os vasos dos lobos pulmonares caudal e acessório, são os mais afectados pela proliferação das vilosidades e distribuição larvar. Estes vasos dilatam na sua porção proximal e tornam-se tortuosos com o aumento da pressão arterial, resultante da resistência do fluxo sanguíneo e da má perfusão dos mesmos (Ware, 2007). Assim, as artérias pulmonares afectadas, perdem a sua conformação normal, ficando dilatadas com uma parede ténue e tortuosa e, com superfície endotelial enrugada (Atkins, 2005; Ware, 2007).

A vasoconstrição pulmonar ocorre secundariamente à produção de substâncias vasoactivas pelas dirofilárias. Mais tarde, a hipóxia induzida por uma má ventilação-perfusão secundária a uma pneumonia eosinofílica ou a uma consolidação pulmonar ou ambas, contribui para a vasoconstrição. O resultado é uma hipertensão pulmonar e o compromisso do débito cardíaco. A hipertensão pulmonar é exacerbada pelo exercício físico ou por qualquer situação que leve ao aumento do *output* cardíaco. O lado direito do coração por sua vez, não resiste ao aumento da pressão e, através de mecanismos de compensação sofre uma hipertrofia excêntrica. No



entanto, em infecções graves, descompensa e progride para uma insuficiência cardíaca direita (Atkins, 2005). Em acréscimo, o *stress* hemodinâmico, as alterações geométricas e a remodelação cardíaca, podem contribuir para uma insuficiência da tricúspide e insuficiência do miocárdio, com activação neurohormonal e sinais clínicos de uma insuficiência cardíaca congestiva (Atkins, 2005; Ware, 2007).

O tromboembolismo pulmonar é desencadeado em consequência da agregação plaquetária, seguido de uma exposição do colagénio secundária à lesão endotelial, causada pelos parasitas. Pode também ocorrer, devido à morte das filárias adultas por um processo espontâneo ou pelo tratamento adulticida (Ferasin & Knight, 2005). O tromboembolismo pode precipitar e até mesmo agravar os sinais clínicos, produzindo ou complicando a hipertensão pulmonar, insuficiência cardíaca direita ou, em casos raros, o enfarte pulmonar (Atkins, 2005). Num estudo experimental de Ferasin & Knight (2005), a administração intravenosa (IV) de um extracto de *D. immitis*, provocou a degranulação dos mastócitos e a produção de histamina, que consequentemente induziu choque nos cães. Este fenómeno é causado por uma substância desconhecida presente no extracto, que pode explicar o colapso circulatório que ocorre ocasionalmente nos cães, após a morte espontânea dos parasitas ou do tratamento adulticida (Ferasin & Knight, 2005).

A morte maciça e súbita das larvas após a terapêutica adulticida, pode comprometer o fluxo sanguíneo pulmonar e originar uma consolidação pulmonar nas áreas afectadas. Este quadro pode se exacerbar quando associado ao exercício. A exacerbação pelo exercício, reflecte-se pelo aumento do fluxo da arterial pulmonar, com saída de mediadores inflamatórios para o parênquima pulmonar, através de artérias pulmonares lesadas e permeáveis. As lesões no parênquima pulmonar podem ser causadas por outros mecanismos, para além da consolidação após um tromboembolismo (Atkins, 2005). A embolização e o enfarte arterial, fibrose e a hipersensibilidade eosinofílica, contribuem para o desenvolvimento de lesões parenquimatosas pulmonares (Ware, 2007). A pneumonia eosinofílica é a causa mais comum na dirofilariose oculta, em que há destruição imunomediada das microfilárias conduzindo a uma amicrofilarémia. Este síndrome ocorre quando há ligação entre os anticorpos e as microfilárias na circulação pulmonar, promovendo uma reacção inflamatória. Outra forma de doença do parênquima pulmonar associada à dirofilariose, mas menos comum, é a pneumonia eosinofílica granulomatosa (Atkins, 2005). A sua causa e patogenicidade são desconhecidas, mas Atkins (2005) sugere ser similar à pneumonia alérgica da dirofilariose. Atkins (2005) menciona que as microfilárias aprisionadas nos pulmões, ficam rodeadas por neutrófilos e eosinófilos, que eventualmente formam granulomas e causam uma linfadenopatia bronquial.

Em casos de infecções graves, particularmente quando o número das L<sub>5</sub> é elevado, podem ocorrer migrações retrógradas, da artéria pulmonar para o lado direito do coração, átrio direito e veia cava. Perante esta situação, a válvula tricúspide perde a sua funcionalidade, e quando associada à hipertensão pulmonar, surge uma insuficiência cardíaca direita (Ferasin & Knight, 2005). A insuficiência cardíaca direita com hepatomegália, diminuição do *output* cardíaco e hemólise intravascular, com hemoglobinémia e hemoglobinúria, é referida como a síndrome de veia cava (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005). A hemólise e a hemoglobinémia, ocorrem quando a membrana celular dos eritrócitos é lesionada, devido ao contacto dos eritrócitos com os parasitas intravasculares. A síndrome de veia cava, também pode ser caracterizada pela presença das L<sub>5</sub> na porção caudal da veia cava e por processos tromboembólicos, acompanhados por uma coagulação intravascular disseminada (CID) (Ferasin & Knight, 2005).

Uma congestão hepática crónica secundária à dirofilariose, pode causar lesões permanentes no fígado e cirrose (Ware, 2007). É também comum haver a formação de imunocomplexos a nível renal em cães com dirofilariose. Este processo caracteriza-se por uma nefropatia com perda de proteína, hipoalbuminémia e, uma redução da anti-trombina plasmática (ATIII), que pode ser exacerbada com um tromboembolismo (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005; Ware, 2007). Apesar de o antigénio causal ser desconhecido, é uma substância produzida pelas microfilárias (Ferasin & Knight, 2005). Embora seja raro, têm sido descritos casos de amiloidose associada a dirofilariose (Ware, 2007).

Ocasionalmente, ocorrem migrações ectópicas, em que as L<sub>5</sub> migram para outras localizações para além do coração e as artérias pulmonares (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005). A espécie *D. immitis* tem sido reportada em localizações como, a câmara anterior do olho, o sistema nervoso central (artérias cerebrais e ventrículos laterais), as artérias sistémicas, o tecido subcutâneo e muscular (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005; Ware, 2007). Num estudo recente realizado por Hodges & Rishniw (2008), foi diagnosticado pela primeira vez, cães com poliartrite secundária à presença de microfilárias intra-articulares. Por isso, estes autores sugerem que a dirofilariose faça parte do diagnóstico diferencial em cães com poliartrite.

#### **4. Interação *D. immitis*/Wolbachia**

A imunopatologia de uma doença causada por filárias é muito complexa, pelo facto de as manifestações clínicas dependerem do tipo de resposta imunitária desencadeada pelo parasita (Kramer et al., 2005; Simón et al., 2007).

Recentemente foi “redescoberta” a existência de uma endossimbiose bacteriana, que pertence ao género *Wolbachia* em muitas espécies de filárias, incluindo *Wuchereria bancrofti*, *Brugia*

*malayi*, *Onchocerca volvulus*, *D. immitis* (Simón et al., 2007; Datta, Maitra, Gayen & Babu, 2009). *Wolbachia* é uma bactéria Gram negativa da Ordem RICKETSIALES, abundante na natureza, e pode ser encontrada nos tecidos do sistema reprodutivo de vários artrópodes. Está presente em pelo menos 16% das espécies de insectos, manipulando o mecanismo reprodutivo destes hospedeiros, promovendo uma incompatibilidade citoplasmática, indução da patogenicidade e feminização do género masculino (Kozek, 2005).

A exposição dos hospedeiros a *Wolbachia* pode ocorrer por três mecanismos: (i) quando as filárias adultas ou as larvas são destruídas, por uma reacção defensiva do hospedeiro, ou após o tratamento; (ii) no útero das larvas L<sub>5</sub>, (iii) através da rede canicular presente na superfície parentérica das cordas laterais do nemátode. Assim, o hospedeiro pode estar exposto a *Wolbachia* continuamente, durante toda a infecção, desenvolvendo anticorpos contra a bactéria e os seus produtos (Kozek, 2005).

Em estudos recentes Simón et al. (2007) identificaram a *Wolbachia* em vários órgãos e células infectadas por *D. immitis*, através de métodos imunohistoquímicos, nas células dos túbulos renais, no glómulo renal ou nas células pulmonares.

A infecção desencadeada em *D. immitis* é única, pelo simples facto do parasita residir no sistema circulatório, permitindo a qualquer produto da bactéria entrar na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado e disseminar-se por todo o organismo. Assim, pode afectar o sistema vascular, os pulmões, o sistema reticuloendotelial do fígado e do baço e, eventualmente o rim comprometendo a filtração renal (Kozek, 2005).

Vários estudos evidenciaram a participação de uma resposta imunitária do tipo Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> (linfócitos T-helper 1 e 2), em vários modelos de filárias. No entanto, nenhum destes estudos teve em conta a presença da bactéria *Wolbachia*. Numa análise com base no tipo de resposta imunitária Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> em cães com dirofilariose, indicaram que os cães microfilarémicos apresentavam um título elevado de imunoglobulinas (Ig) do tipo IgG<sub>1</sub> (Th<sub>2</sub>) contra os antígenos de *D. immitis* e das proteínas de superfície de *Wolbachia* (WSP), enquanto que os cães amicrofilarémicos não apresentavam uma resposta imunitária significativa em comparação com os animais saudáveis. Por outro lado, uma resposta do tipo Th<sub>1</sub> (IgG<sub>2</sub>), foi detectada em ambos os grupos, cães microfilarémicos e amicrofilarémicos, contra os WPS de *Wolbachia*. Estes resultados sugerem, que uma resposta do tipo Th<sub>2</sub> ocorre na doença activa e, uma resposta Th<sub>1</sub> em infecções assintomáticas (Simón et al., 2007; Simón et al., 2008; Oleaga et al., 2009).

Segundo Simón et al. (2007), vários estudos referem que existe uma relação entre a intensidade da resposta humoral a *D. immitis* e o estado parasitológico do cão com dirofilariose. Num estudo realizado por Simón et al. (2007) foi demonstrado que os cães

amicrofilarémicos com um tromboembolismo grave, apresentam um nível de IgG mais elevado, do que os cães com infecções assintomáticas, sugerindo assim, que o nível da resposta imunitária depende também do estado clínico do hospedeiro. Estes autores assim concluíram que os compostos derivados da bactéria *Wolbachia*, apresentam um papel importante na inflamação presente na dirofilariose.

## 5. Quadro clínico

Os sinais clínicos variam consoante a duração e a gravidade da infecção. Na maior parte dos casos, verifica-se um quadro clínico crónico, reflectindo o efeito dos parasitas nas artérias pulmonares e nos pulmões e, secundariamente no coração (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005).

A maioria dos sinais clínicos tem início ou são exacerbados com o exercício físico. Cães que não fazer qualquer tipo de exercício podem nunca exibir qualquer sintoma (Ferasin & Knight, 2005). Atkins, (2005) refere que grande parte dos cães infectados são assintomáticos.

Os sinais clínicos referidos durante a história clínica são muito variáveis. Muitos animais manifestam, perda de peso, intolerância ao exercício, letargia, má condição corporal, tosse, dispneia, síncope e distensão abdominal (ascite) (Atkins, 2005).

Ao exame físico a maioria dos cães aparentam estar normais (Kienle & Kittleson, 1998). No entanto, podem ser observados cães com perda de peso e à auscultação, um segundo ruído cardíaco (S<sub>2</sub>) (13%), murmúrios no lado direito do coração devido à insuficiência da tricúspide (13%) e um galope cardíaco (Atkins, 2005). Quando estabelecida uma insuficiência cardíaca, pode ocorrer uma distensão e uma pulsação típica da jugular, acompanhada por uma hepatoesplenomegália, ascite e intolerância ao exercício (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005; Ware, 2007). Cerca de menos de 10% dos casos, ocorrem arritmias cardíacas e distúrbios de condução (Atkins, 2005).

A resistência vascular pulmonar gerada durante a dirofilariose, reduz o *output* cardíaco do lado direito do coração, necessário durante o exercício, e reduz o volume sanguíneo que retorna ao ventrículo esquerdo. Apesar desta restrição de sangue ao ventrículo esquerdo, a resistência vascular sistémica diminui durante o exercício. A combinação de um fluxo sanguíneo inadequado e da diminuição da resistência, causa uma hipotensão durante o exercício físico, dando origem a uma síncope. Muito provavelmente, este fenómeno é regulado por mecanoreceptores presentes na rede vascular pulmonar e do lado direito do coração. Estes mecanoreceptores estimulam moderadamente o tónus vagal, produzindo bradicárdia e possivelmente uma dilatação arteriolar sistémica (Kienle & Kittleson, 1998).

Sinais respiratórios como, tosse, dispneia e taquipneia são muito comuns, sendo a tosse o sinal clínico mais comum nos cães (Kienle & Kittleson, 1998; Ferasin & Knight, 2005). Estes

sinais respiratórios, desenvolvem-se secundariamente a uma doença pulmonar parenquimatosa (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005). Estes sinais podem também estar associados, embora raramente, a uma granulomatose, a sons abafados e a cianose. Na origem de um tromboembolismo pulmonar, podem surgir sinais adicionais como, febre e hemoptise (Atkins, 2005). Segundo Ware (2007), epistaxis, CID, trombocitopénia, e possivelmente hemoglobínúria, podem estar associados a uma doença arterial pulmonar grave e a um tromboembolismo.

Em casos graves, a hemoptise pode estar presente como consequência de uma ruptura de uma artéria pulmonar (Kienle & Kittleson, 1998; Ferasin & Knight, 2005). As artérias infectadas podem desenvolver aneurismas, em que a tosse pode precipitar a sua ruptura. A hemoptise quando grave, pode levar a um choque hipovolémico e a morte do cão infectado. A melena também pode estar presente em cães com uma hemoptise subaguda ou crónica (Kienle & Kittleson, 1998).

A síndrome da veia cava é uma complicação grave da dirofilariose. Os cães que apresentam esta síndrome, apresentam-se anorécticos, com perda de peso, com dificuldade respiratória, com hemoglobínúria secundária a uma hemólise intravascular, com sinais de insuficiência cardíaca direita e, possível CID (Ferasin & Knight, 2005).

Alguns animais apresentam parésias e até mesmo alterações da locomoção (claudicação), devido à presença de parasitas ectópicos (Ferasin & Knight, 2005).

## **6. Diagnóstico**

O diagnóstico da dirofilariose pode ser estabelecido através da observação morfológica das microfilárias circulantes, pela detecção de antigénios, por esfregaços imunohistoquímicos ou histoquímicos, ou por métodos moleculares (Kienle & Kittleson, 1998; Casiraghi, Bazzocchi, Mortarino, Ottina & Genchi, 2006). Num estudo realizado por Watts et al. (1999), foi possível detectar filárias de *D. immitis* no terceiro estágio larvar ( $L_3$ ) no interior do mosquito, por reacção em cadeia pela polimerase (PCR), com o uso dos primers ROR 91, ROR 92 e ROR 93 para amplificar um segmento do gene 16S rRNA.

Para determinar quando é que os animais devem ser testados, é preciso ter em conta o período pré-patente da dirofilariose. Apesar de as microfilárias e os antigénios presentes no sistema reprodutivo das filárias adultas, serem detectados por volta dos cinco e seis meses e meio após a infecção, respectivamente, o AHS (2005), recomenda que todos os animais com mais de sete meses de idade devem ser testados. Assim sendo, todos os cachorros com menos de sete meses de idade não necessitam de ser testados (AHS, 2005). No entanto Kienle & Kittleson (1998) recomendam que todos os cães com mais de 6 meses de idade e que não foram

submetidos a qualquer método profilático, devem ser avaliados quanto à presença de microfilárias e de filárias adultas.

Quando um animal é suspeito de estar infectado por *D. immitis*, deve ser examinado com muita precaução. O diagnóstico deve ser feito com base no exame físico, na análise de sangue para detectar as microfilárias, nas radiografias torácicas, para determinar o grau de gravidade da doença, e se necessário, na ultrasonografia e na electrocardiografia. Uma vez diagnosticada a infecção, devem ser avaliados, o hemograma, o perfil bioquímico e a urianálise, de modo a detectar alguma complicação ou até mesmo uma doença secundária (Kienle & Kittleson, 1998).

### **6.1. Detecção de microfilárias**

Idealmente o diagnóstico deve ser feito por avaliações de rotina, antes de qualquer manifestação de sintomas. Cães que habitam em áreas onde a dirofilariose é endémica, devem ser testados, principalmente quando não estão a fazer nenhum tratamento preventivo (Atkins, 2005).

As técnicas que permitem a identificação das microfilárias de *D. immitis* no sangue periférico são: o exame directo do sangue total ao microscópio óptico (Gota a fresco), o exame da camada inferior ao *buffy coat* em tubos de microhematócrito, a técnica de Knott modificada ou a técnica de filtração (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005; Carvalho & Santos, 2006; Ware, 2007).

A maioria dos cães microfilarémicos podem ser diagnosticados, através da observação ao microscópio óptico da motilidade das microfilárias (AHS, 2005). No entanto, apesar de o exame microscópico ao sangue total ser rápido, fácil e económico, não permite a identificação do parasita e é uma técnica insensível e inespecífica, quando a carga parasitária é baixa (Ferasin & Knight, 2005; Madeira de Carvalho & Santos, 2006).

A técnica de Knott modificada e a técnica de filtração, são 25 % mais sensíveis do que o exame directo ao microscópio (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005; Calvert & Thomason, 2008). A técnica de Knott modificada é uma técnica rápida que permite concentrar as microfilárias de um determinado volume de sangue. A sua identificação é realizada de acordo com as características morfológicas da Tabela 1. A técnica da filtração baseia-se na retenção das microfilárias num filtro e da sua observação ao microscópio (Madeira de Carvalho & Santos, 2006). Ambas estas técnicas promovem a lise dos eritrócitos permitindo a observação das microfilárias (Kienle & Kittleson, 1998; Madeira de Carvalho & Santos, 2006; Ware, 2007).

**Tabela 1.** Características morfológicas de *D. immitis* e *A. reconditum* (Adaptado Carvalho & Santos, 2006)

Espécie	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Outras características
<i>Dirofilaria immitis</i>	306,8 (218 – 340)	5,9 (4,5 – 7,3)	Extremidade anterior cônica, posterior recta
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	262,0 (145 – 233)	4,54 (3,5 – 6,5)	Extremidade anterior cilíndrica com um gancho cefálico, posterior em gancho (Georgi, 1980)

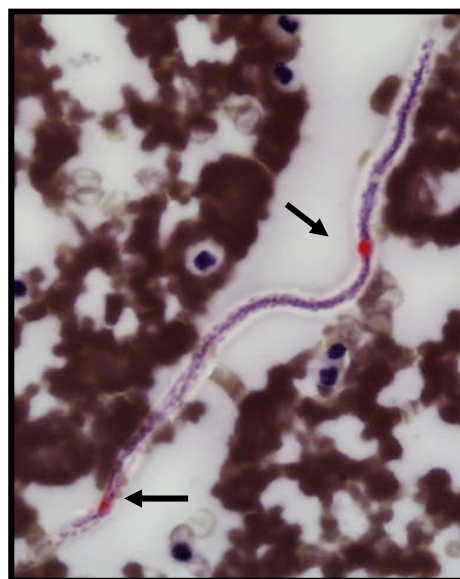
Nem todas as microfilárias presentes na circulação sanguínea são de *D. immitis*. O *Acanthocheilonema reconditum* (*Dipetalonema reconditum*) é um parasita subcutâneo não patogénico, que também produz microfilárias (Kienle & Kittleson, 1998). A diferenciação destas microfilárias é crucial, porque pode não ser necessário implementar uma terapêutica tão agressiva como a usada contra *D. immitis* (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005).

A técnica de Knott modificada é o método preferencial para observar a morfologia e as dimensões das microfilárias e diferenciar as de *D. immitis* de outras espécies de filárias não patogénicas como *Acanthocheilonema reconditum* (AHS, 2005; Ware, 2007).

Um outro método que permite fazer a distinção destas espécies é um método histoquímico, baseado na coloração das microfilárias pela fosfatase ácida (Casiraghi et al., 2006; Carvalho & Santos, 2006). Este método permite a diferenciação mais precisa pela utilização de corantes histoquímicos para a actividade da fosfatase ácida. A microfilárias de *D. immitis* mostra manchas ácido-fosfato positivas vermelhas distintas no poro excretor e no ânus, enquanto que *A. reconditum* fica totalmente rosado (Figura 13) (Carvalho & Santos, 2006). Mais recentemente, foram desenvolvidos métodos imunohistoquímicos e moleculares, que permitem esta diferenciação (Casiraghi et al., 2006). Mar et al. (2002) usando o primer ITS2 (*internal transcribed spacer region 2*) num ensaio de PCR, conseguiu diferenciar as microfilárias de *D. immitis* das de *A. reconditum*, com uma especificidade de 100% e uma sensibilidade elevada.

Nenhum destes testes consegue excluir por completo uma infecção, devido à existência de infecções amicrofilarémicas (5% a 67%) e, pelo facto de que podem ocorrer falsos negativos,

**Figura 13.** Microfilária de *D. immitis* corada pela fosfatase ácida



**Legenda:** Poro excretor e ânus corados (setas)

principalmente quando existem poucas microfilárias, filárias do mesmo sexo, quando a quantidade de sangue é pouca, num exame directo de gota a fresco e com variação do número de microfilárias no sangue periférico consoante a hora do dia (Atkins, 2005; Ware, 2007).

O número de microfilárias no sangue periférico não corresponde ao número total de filárias adultas presentes no organismo, não sendo possível usar esta característica, como critério para determinar a gravidade da infecção (Atkins, 2005).

Na prática, a maioria dos testes usados para identificar as microfilárias são suplementados com testes de pesquisa de antígenos. Atkins (2005) recomenda a utilização da técnica de Knott modificada, mesmo que o cão seja antígeno positivo, de modo a determinar a carga de microfilárias ou, para saber se os donos devem ou não continuar com a terapêutica preventiva.

## **6.2. Métodos serológicos (imunodiagnóstico)**

Os testes de pesquisa de antígenos mais usados no diagnóstico da dirofilariose são a *Enzyme Linked Immunosorbent assay* (ELISA), a imunocromatografia e a hemaglutinação (Kienle & Kittleson, 1998; Ware, 2007). Podemos visualizar na Tabela 2 os testes serológicos utilizados nos cães. Estes kits comerciais detectam no sangue, soro ou plasma, proteínas específicas produzidas pelo sistema reprodutor das filárias adultas (Kienle & Kittleson, 1998, Ferasin & Knight, 2005). Assim, só detectam fêmeas adultas (Kienle & Kittleson, 1998). Num estudo recente, Oleaga et al. (2009), indentificaram as proteínas, actina-1, dissociação do inibidor alfa rab GDP e quatro enzimas glicolíticas, a enolase, glucose fosfatase isomerase, fosfatoglicerase cinase e triosefosfato isomerase, como exclusivas de cães microfilarémicos.



**Tabela 2.** Kits comerciais de testes de antigénio (Adaptado de Atkins, 2005) \*

Fabricante	Produto	Formato	Tipo de teste	Tipo de amostra	Espécie	Tempo de realização (min.)	Etápas
Heska	Solo Step™ CH	M	IMC	P, S, ST	Cão	10 (WB) 5 (S, P)	1
Heska	Solo Step™ CH Test Strips	M	IMC	P, S	Cão	5	1
IDEXX	PetCheck® Heartworm Antigen PF	Pç	E	P, S, ST	Cão e Gato	20	9 ou 10
IDEXX	SNAP™ Heartworm Antigen Kit	M	E	P, S, ST	Cão	8	4
IDEXX	SNAP™ 3Dx	M	E	P, S, ST	Cão	8	4
Suynbiotics	Witness® HW	M	IMC	P, S, ST	Cão	10	4
Synbiotics	DiroCHECK® HW	Pç	E	P, S	Cão e Gato	20	8

**Legenda:**\*Por ordem alfabética segundo o fabricante. M, Membrana; Pç, Poçilho; IMC, Imunocromatografia; E, ELISA; P, plasma; S, soro; ST, sangue total.

A geração actual dos testes serológicos, permite identificar a maioria das infecções ocultas (amicrofilarémicas), mesmo quando existe apenas uma única filária adulta, sendo quase 100% específicos (AHS, 2005). Dado, que menos de 1% das infecções são microfilarémicas e antigénio negativo, é possível detectar mais infecções usando testes de antigénios do que apenas através da pesquisa de microfílarias (Kienle & Kittleson, 1998; AHS, 2005; Atkins, 2005).

A prevalência de infecções amicrofilarémicas varia entre 5% a 67% (tipicamente entre 10% a 20%) (Atkins, 2005). Existem quatro razões possíveis para que cães estejam infectados e amicrofilarémicos, quando estão perante uma infecção pré-patente (adultos imaturos), quando existe apenas filárias do mesmo sexo, quando as fêmeas são estéreis e, quando existe uma destruição imunológica pelo hospedeiro (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005; Ware, 2007). Em cães com infestações pré-patentes, as filárias adultas presentes nas artérias pulmonares podem não estar maduras o suficiente para se reproduzirem. Estes cães podem manifestar sintomas, mas apenas por um curto período ou então são assintomáticos. É previsto que cães com infestações com filárias do mesmo sexo tenham uma carga parasitária baixa. Consequentemente, não só podem ser negativos à pesquisa de microfílarias, como

também à pesquisa de antígenos. As fêmeas podem ficar estéreis pelos fármacos utilizados no tratamento e prevenção da dirofilariose (Kienle & Kittleson, 1998). Estes fármacos tornam estes cães amicrofilarémicos e os cães que desenvolvem uma resposta imunológica contra as microfilárias, conseguem eliminar todas da corrente sanguínea (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005).

Os testes serológicos (*kits* comerciais ELISA e imunocromatografia) são usados actualmente como teste de rotina e em caso de suspeita de uma infecção por *D. immitis*. Estes testes são fáceis de manusear e apresentam uma elevada sensibilidade e especificidade (Ware, 2007). Segundo Ferasin e Knight (2005) apresentam uma sensibilidade de 98%, que decresce para 35% quando a carga parasitária é baixa. No entanto, têm como principais desvantagens, detectar apenas antígenos de fêmeas adultas e produzir resultados negativos durante os primeiros 6 (5 a 8) meses de cada infecção, quando apenas estão infectados por machos e, em infecções com uma carga parasitária baixa (AHS, 2005; Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005; Ware, 2007). Os falsos positivos também podem ocorrer, porém, estão associados a erros técnicos (AHS, 2005; Ware, 2007). Quando um resultado é duvidoso, o AHS (2005) recomenda a repetição do teste e se ainda continuar duvidoso, o diagnóstico deve ser confirmado por outros métodos, por outro teste de pesquisa de antígeno, testes de concentração das microfilárias, radiografias e até mesmo ecocardiografias.

Num estudo recente, com base na avaliação da performance de três testes para pesquisa de antígeno (*Kits* comerciais), em cães infectados, mas com carga parasitária baixa ( $\leq 4$  adultos), permitiram concluir que em média, estes testes apresentam uma sensibilidade de 79% e 97% de especificidade. No entanto, apresentam uma sensibilidade tanto mais reduzida quanto mais baixa for a carga parasitária, exibindo uma sensibilidade de 85%, 88% e 89%, para duas, três e quatro fêmeas adultas respectivamente, em média nos três testes. Apesar dos bons resultados obtidos neste estudo, podem ocorrer falsos negativos (Atkins, 2005).

Alguns testes de pesquisa de antígeno ELISA são capazes de quantificar a carga parasitária, com base na concentração dos antígenos. A técnica de ELISA semi-quantitativo (Snap<sup>TM</sup>) consegue determinar a carga de antígenos e assim relacionar com o grau da carga parasitária (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005). Este tipo de teste tem vindo a ser muito útil na prevenção de uma complicação, como um tromboembolismo, que ocorre usualmente após o tratamento adulticida, quando a carga parasitária é elevada (Atkins, 2005). A concentração dos antígenos é directamente proporcional à carga parasitária (Kienle & Kittleson, 1998). Assim, o uso deste tipo de teste é vantajoso, porque consegue detectar concentrações baixas e elevadas dos antígenos presentes (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005). O DiroCHECK<sup>®</sup> também permite quantificar a concentração dos antígenos, mas de uma maneira mais

complexa. São necessárias diluições do soro para determinar a titulação. Esta titulação é determinada em duas vezes no soro ou no plasma com um tampão salino nas seguintes diluições, 1:1, 1:2, 1:4, 1:4, 1:8, 1:6, 1:32, 1:64 e 1:128. Os cães que são positivos à diluição 1:32, apresentam um grande risco em desenvolver um tromboembolismo após a terapêutica adulticida (Kienle & Kittleson, 1998).

Os testes de pesquisa de antigénio também podem ser usados para confirmar a eficácia da terapêutica (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005). Após a morte das filárias, a concentração dos antigénios decresce até limites indetectáveis, 3 a 5 meses após a terapêutica. Segundo Atkins (2005) e Ferasin e Knight (2005), a concentração de antigénios é indetectável entre 8 a 12 semanas após o tratamento.

### **6.3. Radiografia**

Radiografias torácicas devem ser efectuadas rotineiramente num cão ou num gato com dirofilariose, sem levar em conta os sinais clínicos que manifesta ou dos achados clínicos no exame físico (Kienle & Kittleson, 1998). Apesar de não ser tão eficiente como os testes de rotina, as radiografias torácicas podem ser um bom método de diagnóstico da dirofilariose, na determinação da gravidade da doença e, na avaliação de alterações existentes no parênquima pulmonar (Atkins, 2005).

As alterações radiográficas, desenvolvem-se e, estão presentes em 85% dos casos. Atkins (2005) refere um estudo, em que as alterações radiográficas incluem, um aumento do tamanho do lado direito do coração (60%), aumento proeminente da artéria pulmonar (70%), aumento do tamanho e da densidade das artérias pulmonares (50%) e da tortuosidade das artérias pulmonares (50%). Quando instituída uma insuficiência cardíaca, podemos observar um aumento da veia cava, como também um derrame pleural ou ascite (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005).

As projecções mais usadas no diagnóstico da dirofilariose são, a ventrodorsal ou dorsoventral e lateral (Kienle & Kittleson, 1998). As alterações observadas nas artérias pulmonares em cães com dirofilariose, são consistentes com um aumento do diâmetro arterial, aumento da tortuosidade e da existência de artérias atenuadas (Kienle & Kittleson, 1998; AHS, 2005; Ware, 2007; Calvert & Thomason, 2008). A projecção ventrodorsal, é uma projecção fácil de efectuar, que minimiza o *stress* nos pacientes, permitindo avaliar a silhueta cardíaca. No entanto, a projecção dorsoventral permite uma melhor visualização dos vasos pulmonares dos lobos caudais (Atkins, 2005). Estes vasos estão alterados, quando o seu diâmetro foi superior ao diâmetro da 9ª costela, onde a artéria e a costela interceptam (Atkins, 2005; Ware, 2007; Calvert & Thomason, 2008). As alterações encontradas mais comuns consistem, numa dilatação central e na tortuosidade das artérias pulmonares, com os vasos periféricos

atenuados (Ware, 2007). A projecção lateral possibilita uma visualização melhor a artéria pulmonar cranial (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005; Ware, 2007). Normalmente, esta artéria não está maior que a zona proximal da 3ª ou 4ª costela ou das veias acompanhantes (Atkins, 2005; Ware, 2007).

As alterações no parênquima pulmonar são melhor avaliadas por métodos radiográficos (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005). Os achados radiográficos de uma pneumonia, incluem uma densidade mista, intersticial e alveolar, que é muito típica e predominante nos lobos pulmonares caudais. A granulomatose nodular eosinofílica, é um processo inflamatório que afecta os nódulos intersticiais, associado a uma linfadenopatia bronquial e ocasionalmente, derrame pleural. Num tromboembolismo pulmonar, os achados radiográficos são consistente com um infiltrado intersticial e alveolar, que afecta particularmente os lobos caudais, reflectindo o aumento da permeabilidade vascular e a inflamação anteriormente citada. A consolidação pulmonar é acompanhada por uma embolização maciça, enfarte pulmonar ou ambas (Atkins, 2005).

#### **6.4. Electrocardiografia**

A electrocardiografia é muito útil na detecção de arritmias, porém, é um método insensível na detecção do aumento do coração em comparação com a radiografia e a ecografia. Se radiograficamente não é possível diagnosticar a dirofilariose, então é pouco provável que o electrocardiograma (ECG) seja útil na ausência de arritmias. À excepção da síndrome da veia cava e de uma insuficiência cardíaca, as arritmias são raras (2% a 4%). No entanto, a existência de um aumento do ventrículo direito é indicativo de dirofilariose. Atkins (2005) refere um estudo realizado por outros autores em que 38% a 62% dos casos, exibem alterações no ECG. Contudo, um outro autor, demonstrou que apenas 6% de 276 cães, apresentam alterações no ECG indicativas de um aumento do ventrículo direito. Este mesmo autor refere que os melhores parâmetros para detectar uma dirofilariose são, na derivação II (LII), uma onda S superior a de 0,8 mv (milivolts) e um eixo eléctrico maior que 103° (Atkins, 2005). Em resumo, tem de apresentar pelo menos três alterações nos parâmetros de ECG compatíveis com um aumento do lado direito do coração. O aumento da onda P-*pulmonale* é indicativo de um aumento do átrio direito, que é um achado pouco comum na dirofilariose (Atkins, 2005; Ware, 2007).

#### **6.5. Ecocardiografia**

A ecocardiografia fornece uma prova evidente de uma infecção por dirofilárias, e também permite observar a anatomia cardíaca e as suas funções. No entanto, não é um método eficaz no diagnóstico da dirofilariose, principalmente em cães com uma carga parasitária leve,

porque, a maioria das filárias alojam-se nos ramos periféricos das artérias pulmonares, longe do campo ecográfico. Quando o número de filárias é grande, estas estão presentes na artéria pulmonar, nos ramos direito e proximal esquerdo dos lobos, no lado direito do coração ou em alguns casos na veia cava (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005; Calvert & Thomason, 2008). Ecograficamente a parede das filárias adultas é muito ecogénica e produz uma imagem distinta, de duas formas lineares paralelas com uma região lucente entre elas (Kienle & Kittleson, 1998; AHS, 2005; Ferasin & Knight, 2005; Ware, 2007).

Em infecções graves podemos observar uma dilatação do ventrículo e do átrio direito, uma hipertrofia excêntrica do ventrículo direito, um movimento paradoxal do septo, uma redução do lado esquerdo do coração e uma dilatação da artéria pulmonar (Ware, 2007; Calvert & Thomason, 2008). Quando presente, podemos também visualizar a regurgitação da válvula tricúspide ou das válvulas pulmonares. O aumento da velocidade do fluxo sanguíneo pode ser identificado com o uso de um Doppler (Kienle & Kittleson, 1998).

O cálculo do rácio das dimensões internas do ventrículo esquerdo e do direito é muito útil, principalmente em cães com dirofilariose que apresentam uma redução de 3 a 4 para um rácio de 0,7 (Atkins, 2005).

#### **6.6. Patologia clínica**

A avaliação dos parâmetros sanguíneos e bioquímicos, apesar de o seu uso ser limitante no diagnóstico de dirofilariose, é útil na revelação ou da avaliação de outras doenças concomitantes (Atkins, 2005).

O hemograma apresenta-se normal na maioria dos cães com dirofilariose. No entanto, 10% dos cães com infecções médias a moderadas e 60% dos cães com infecções graves exibem uma anemia não regenerativa (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005). No leucograma, 20% a 60% dos cães manifestam uma neutrofilia, 85% dos cães com eosinofilia e 10% com basofilia (Atkins, 2005). Segundo Kienle & Kittleson (1998) a eosinofilia é comum em 85% dos cães microfilarémicos e em 95% dos cães amicrofilarémicos, devido à destruição imunológica das microfílias. Cães com uma dirofilariose crónica, síndrome da veia cava e CID, podem apresentar uma trombocitopenia, que é muito comum, em 1 a 2 semanas após a terapêutica adulticida (Atkins, 2005; Ware, 2007). Por outro lado, cães com síndrome da veia cava ou com um tromboembolismo grave, podem manifestar uma trombocitopenia associada a uma hemoglobinúria (Calvert & Thomason, 2008).

A maioria dos cães com dirofilariose, não exhibe qualquer alteração nas bioquímicas sanguíneas. Contudo, numa dirofilariose grave, principalmente quando há uma insuficiência cardíaca, 10% dos casos, manifestam um aumento das enzimas hepáticas e, ocasionalmente é constatada uma hiperbilirrubinemia (Atkins, 2005). Apenas 5% dos casos, exibem uma

azotemia pré-renal com origem numa desidratação ou numa insuficiência cardíaca, ou então, secundária a uma glomerulonefrite (Atkins, 2005; Calvert & Thomason, 2008). Segundo Atkins (2005), 10% a 30% dos cães infectados manifestam uma proteinúria (albuminúria), enquanto Ware (2007) refere ser 20% a 30%. Se a doença glomerular for muito pronunciada, a hipoproteinemia (hipoalbuminemia) pode complicar a estado clínico do cão (Atkins, 2005; Ware, 2007; Calvert & Thomason, 2008). Os achados clínico-patológicos mais graves, estão associados com o quadro clínico mais grave (Atkins, 2005).

## **7. Terapêutica**

### **7.1. Terapêutica adulticida**

No geral, qualquer canídeo com dirofilariose, apresenta uma grande probabilidade de recuperação quando submetido a um tratamento adulticida. No entanto, cães com infecções graves ou com complicações concomitantes, são um desafio, porque podem não tolerar a terapêutica da mesma maneira que em infecções ligeiras (Kienle & Kittleson, 1998).

É necessário, que cada animal seja avaliado antes de cada tratamento. Existem três objectivos nesta avaliação, que consistem, em detectar a probabilidade de ocorrência de uma toxicidade ao tratamento adulticida, identificar os cães com maior risco em desenvolver um tromboembolismo e o seu prognóstico (Kienle & Kittleson, 1998).

De acordo com Ferasin e Knight (2005) os cães com dirofilariose são classificados em três classes (Tabela 3), de modo a determinar o prognóstico e o protocolo terapêutico a ser implementado.

**Tabela 3.** Classificação da dirofilariose (Adaptado de Ferasin & Knight, 2005)

	<b>Classe 1</b>	<b>Classe 2</b>	<b>Classe 3</b>
<b>Grau de gravidade</b>	Média	Moderada	Grave
<b>Sinais clínicos</b>	Nenhum ou tosse esporádica	Tosse esporádica, intolerância média ao exercício	Tosse persistente (+- hemoptise), intolerância ao exercício moderada a grave, perda de peso, dilatação abdominal
<b>Exame físico</b>	Normal	Aumentos dos sons pulmonares	Auscultação anormal (2º ruído cardíaco (S2), galope cardíaco, murmúrios cardíacos, aumento dos sons pulmonares), taquipneia/dispneia, ascite
<b>Alterações radiológicas</b>	Normal	Dilatação ligeira das artérias pulmonares, padrão irregular alveolar/intersticial	Aumento do lado direito do coração, padrão irregular ou difuso alveolar/intersticial, dilatação e tortuosidade das artérias pulmonares, hepatomegália, ascite
<b>Alterações na ecocardiografia</b>	Normal	Aumento ligeiro das artérias pulmonares e uma hipertensão pulmonar média	Dilatação severa das artérias pulmonares e hipertensão pulmonar, aumento do ventrículo e átrio direito
<b>Prognóstico</b>	Excelente	Bom com sucesso terapêutico	Reservado

Na classe 1, estão os cães que manifestam uma infecção subclínica e sinais clínicos médios, sem qualquer alteração radiográfica (Kienle & Kittleson, 1998; Calvert & Thomason, 2008). Geralmente são cães jovens (média de 3,8 anos a 5,4 anos na classe 2 e, 7,4 anos na classe 3). Cerca de 75% dos cães, apresentam uma concentração de antígenos inferior a 1,7 µg/mL (Kienle & Kittleson, 1998).

Classe 2, é a classe mais comum, em que os cães manifestam uma doença clínica moderada (Kienle & Kittleson, 1998; Calvert & Thomason, 2008). Apresentam comumente sinais clínicos médios, como tosse, intolerância ao exercício, má condição do pêlo e, algumas alterações radiográficas. Por volta de 55% dos cães nesta classe, têm uma concentração de antígeno superior a 1,7 µg/mL. Cães com concentrações de antígenos elevadas, exibem uma incidência elevada a complicações tromboembólicas (Kienle & Kittleson, 1998).

Cães da classe 3 apresentam uma dirofilariose grave. Manifestam quase sempre sinais clínicos (tosse persistente, perda de peso, dispneia), uma insuficiência cardíaca direita e alterações significativas radiográficas (Kienle & Kittleson, 1998; Calvert & Thomason, 2008). Os

animais desta classe apresentam uma concentração de antígenos inferior às restantes classes, o que muito provavelmente, deve-se à morte de algumas filárias (Kienle & Kittleson, 1998).

A síndrome da veia cava, é usualmente referida como classe 4. No entanto, esta síndrome não é um reflexo da gravidade da doença arterial pulmonar, pelo contrário, é uma síndrome causada pela obstrução do fluxo sanguíneo (Calvert & Thomason, 2008).

Os cães classificados na classe 1 e 2 recuperam consideravelmente, após o tratamento adequando e com restrição de exercício físico. O resultado da classe 3, é menos encorajador e o tratamento pode ser agressivo e dispendioso (Calvert & Thomason 2008).

A pré-avaliação dos cães antes da terapêutica, varia com o estado clínico do paciente e da coexistência de uma outra doença, que pode afectar o resultado final (AHS, 2005). Então, qualquer animal antes de iniciar a terapêutica, deve ser avaliado pelo exame clínico e submetido a análises hematológicas e bioquímicas, urianálise, para determinar a densidade urinária e a existência de proteinúria, teste de pesquisa de antígenos e exames radiográficos (Kienle & Kittleson, 1998; AHS, 2005). Cães com aumento das enzimas hepáticas não estão indicados para o tratamento adulticida. Contudo, em cães com icterícia ou com uma azotémia pré-renal, apenas está contra-indicado o tratamento com tiacetarsemida (Kienle & Kittleson, 1998; Calvert & Thomason, 2008).

#### **7.1.1. Melarsomina**

Na maioria dos casos de dirofilariose, é imperativo eliminar os parasitas do hospedeiro definitivo. A tiacetarsemida, foi durante décadas a única droga usada para este efeito, mas actualmente não é disponibilizada. Hoje em dia, é utilizado um composto organoarsénico, a melarsomina dihidroclorida (Immiticide<sup>®</sup>), mais seguro porque é menos nefrotóxico e hepatotóxico e mais eficaz que a tiacetarsemida (Ferasin & Knight, 2005). É administrado em duas doses (2,5 mg/kg por via intramuscular (IM) cada 24 horas), proporcionando uma eficiência de 96%. Apresenta um período de latência cinco vezes superior à tiacetarsamida, e os seus metabolitos estão livres no plasma (Atkins, 2005). Atkins (2005) menciona um estudo realizado em 382 cães infectados por *D. immitis* recebendo tratamento com Immiticide<sup>®</sup>, em que não se desenvolveu nenhuma complicação, como uma intoxicação hepática (que ocorre em 10% a 30% com a tiacetarsemida) e nem nenhum caso de tromboembolismo pulmonar.

O Immiticide<sup>®</sup> é constituído por 50 mg de melarsomina e 33,75 mg de glicina, como pó liofilizante, com um frasco de 2 mL de água esterilizada. Apresentando uma concentração final de 25 mg/mL num volume final de 0,1 mL/kg (Kienle & Kittleson, 1998). Este composto é administrado por via intramuscular, nos músculos lombares epaxiais, entre as vértebras L3 e L5 (Kienle & Kittleson, 1998; Ware, 2007; Calvet & Thomason, 2008). É administrado nestes músculos, por proporcionarem uma boa vascularização e drenagem



linfática (Ware, 2007). Quando administrado desta forma, o fármaco é absorvido rapidamente para a corrente sanguínea (50% em 5 minutos), sendo metabolizado no fígado por hidrólise e, excretado pela bÍlis. Os derivados do ácido arsénico são excretados pela urina (Kienle & Kittleson, 1998).

O protocolo do Immiticide<sup>®</sup> depende da classificação da doença, segundo a evolução clínica e a concentração dos antigénios (Kienle & Kittleson, 1998). O protocolo *standard*, consiste em duas injeções separadas por 24 horas, segundo o fabricante e, é recomendado para cães com baixo risco em desenvolver complicações, como um tromboembolismo. Cães com um elevado risco, é possível eliminar as filárias em duas fases, com uma dose inicial, seguida 4 a 6 semanas depois, de duas doses do protocolo *standard* (protocolo alternativo) (AHS, 2005; Ware, 2007). O protocolo alternativo é o tratamento elegido pelo AHS (2005) e por vários hospitais dos Estados Unidos da América, em qualquer fase da doença, devido à elevada segurança e benefícios eficazes, e subsequentemente são poucos os cães que necessitam de mais tratamentos com Immiticide<sup>®</sup>.

Para cães classificados na classe 1 e 2, com baixa concentração de antigénios, são sugeridas duas administrações separadas por 24 horas, na dose de 2,5 mg/kg, por via IM, com alternância dos músculos epaxiais direitos e esquerdos. Nos cães da classe 2 e 3, com concentrações elevadas de antigénios, é recomendada o protocolo alternativo (Kienle & Kittleson, 1998; Ferasin & Knight, 2005; Ware, 2007; McCall et al., 2008). Ware, (2007) alude que os cães com síndrome da veia casa (classe 4), não devem ser submetidos ao tratamento adulticida, sem que antes haja a remoção cirúrgica das filárias.

Apesar de a melarsomina ser segura, a sua administração, apresenta uma margem de segurança curta, que pode originar algumas reacções adversas. A administração em três fases, de uma dose de 7,5 mg/kg, pode desencadear uma inflamação pulmonar, edema pulmonar e até mesmo morte do paciente (Kienle & Kittleson, 1998; Ware, 2007). Colapso, ptialismo, vômito, alterações respiratórias, estupor e morte, ocorre quando a dose é tripla da recomendada (Ware, 2007). Este mesmo autor refere que a toxicidade da melarsomina pode ser revertida com dimercaprol, na dose de 3 mg/kg, via IM, que também reduz a actividade adulticida. Na dose normal de 2,5 mg/kg, podem ocorrer algumas reacções adversas, como tosse (22%), depressão e letargia (15%), anorexia (13%), febre (7%), congestão pulmonar (5%), vômito (5%), diarreia (2,5%), dispneia (2,5%), ptialismo (2%) e *panting* (2%) (Kienle & Kittleson, 1998). Estas reacções adversas podem ocorrer após a segunda administração de Immiticide<sup>®</sup>, mesmo que na primeira administração não tenha sido observada qualquer reacção. Por isso, todos os cães devem ser monitorizados 24 horas após a segunda

administração (Kienle & Kittleson, 1998). A restrição de exercício físico após a administração do Immiticide<sup>®</sup>, reduz a ocorrência destas complicações (AHS, 2005; Atkins, 2005).

É comum existir dor e haver formação de edema no local de injeção, durante alguns dias (Kienle & Kittleson, 1998; AHS, 2005). Grande parte das reações graves, ocorrem devido à saída do fármaco, da zona intramuscular para o tecido subcutâneo. Sendo assim, é necessário fazer compressão durante 1 a 2 minutos após a injeção, para minimizar esta ocorrência. O aumento da concentração no soro da creatina quinase (CK), é indicativo de uma necrose muscular. A área onde a injeção é aplicada, é histologicamente consistente, com um infiltrado celular, necrose e hemorragia, seguido de fibrose (Kienle & Kittleson, 1998).

A grande vantagem deste fármaco, é a sua flexibilidade de administração (três injeções num mês ou mais), que permite uma eliminação inicial de 50% das filárias, seguida de uma segunda dose, obtendo uma eficiência de 100% (Atkins, 2005).

Num estudo, em que 55 cães com dirofilariose grave foram submetidos a este tratamento, houve uma recuperação de 96%, verificando-se seroconversão 90 dias após o tratamento (Atkins, 2005).

#### **7.1.2. Lactonas macrocíclicas**

As lactonas macrocíclicas são uma opção alternativa, quando a terapêutica adulticida é rejeitada (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005). As avermectias (ivermectina) administrada mensalmente por 32 meses consecutivos, oferece uma eficiência de quase 100%, em infecções ligeiras (Atkins, 2005). Num estudo realizado por Venco, McCall, Guerrero & Genchi, (2004) foi demonstrado uma eficiência do tratamento adulticida com ivermectina, em 71% dos cães administrados com ivermectina isolada (6 µg/kg) ou associada ao pamoato de pirantel (Heartgard Plus<sup>®</sup>) durante 24 meses e, apresentavam uma redução dos níveis de antígenos. No entanto, estes resultados são inferiores aos obtidos em outros estudos. Este tratamento é indicado e altamente eficiente contra as larvas tardias pré-cardíacas e em filárias adultas jovens (< 7 meses). Assim, o tratamento tem de ser prolongado durante pelo menos um ano e, provavelmente necessário mais de dois anos para que todas as filárias sejam eliminadas (AHS, 2005; Venco et al., 2004; Ware, 2007). Porém, o uso da ivermectina, não substitui o tratamento convencional adulticida (AHS, 2005; McCall, 2005; Venco et al., 2004; Ware, 2007; McCall et al., 2008). Se a terapêutica arsenical for recusada, então a administração da ivermectina em doses profiláticas é recomendada e, reduz gradualmente o número de filárias adultas, mas que em infecções crônicas, pode não ser clinicamente benéfico (AHS, 2005; Ware, 2007). Ainda não foi reportada, a capacidade adulticida das restantes lactonas macrocíclicas (AHS, 2005). Ware (2007), refere que a capacidade

adulcida das outras lactonas macrocíclicas (Selamectina, moxidectina injectável e milbemicina oxima) é reduzida.

### **7.1.3. Complicações após o tratamento adulticida**

#### **7.1.3.1. Infecção por *Wolbachia***

A maioria das filárias, incluindo *D. immitis*, pode hospedar uma bactéria intracelular, pertencente ao género *Wolbachia* (AHS, 2005). Os seus produtos metabólicos e as proteínas de superfície originam uma resposta inflamatória, que afecta principalmente os pulmões e os rins como já foi referido anteriormente.

O AHS (2005) menciona que durante os primeiros meses de infecção, a aplicação de uma terapêutica com tetraciclina, por exemplo doxiciclina, é letal para as filárias com *Wolbachia* e suprime a microfilarémia. A administração de doxiciclina após o tratamento adulticida, reduz consideravelmente o número de bactérias. Contudo, não existem estudos para comprovar este facto (Calvert & Thomason, 2008).

Um estudo realizado por McCall et al. (2008) relata que a eliminação de *Wolbachia* com tetraciclina, também previne o desenvolvimento dos estados larvares, porque inibe a embriogénese nas filárias adultas e eventualmente, matam as filárias adultas, em um ano e meio a dois anos após o início do tratamento. Segundo McCall et al. (2008) a combinação de ivermectina com doxiciclina, permite eliminar as microfilarías na 10<sup>a</sup> semana, e 78,3% das filárias adultas na 36<sup>a</sup> semana. Neste mesmo estudo, foram recolhidas L<sub>3</sub> de mosquitos alimentados em cães microfilarémicos e tratados com doxiciclina. As L<sub>3</sub> apresentavam-se morfológicamente e com a motilidade normal, no entanto, não conseguiram desenvolver-se no cão. Perante esta situação, é sugerido que a administração de ivermectina associada a doxiciclina durante vários meses antes do tratamento adulticida, ou até mesmo sem qualquer tratamento, elimina as filárias adultas, diminuindo o risco de um tromboembolismo (McCall et al., 2008).

Foi demonstrado que a aplicação de uma terapêutica à base de tetraciclina a cães com dirofilariose, resulta na esterilização das filárias fêmeas (AHS, 2005; Datta et al., 2009).

Num estudo recente sobre a acção entre saponinas triterpenóides isoladas do funículo da *Acacia auriculiformis* e as tetraciclina, sobre a bactéria *Wolbachia*. Foi observado um efeito sinérgico ou aditivo pelas tetraciclina. À medida que as larvas enfraqueciam pela depleção de *Wolbachia*, as microfilarías podiam ser destruídas pelas saponinas. Apesar da observação de uma supressão da microfilarémia após a administração de tetraciclina associadas a saponinas, há necessidade de mais estudos que comprovem este efeito (Datta et al., 2009).

### **7.1.3.2. Outras complicações**

Uma glomerulonefrite, uma pneumonia alérgica, uma granulomatose eosinofílica, uma embolização pulmonar, uma insuficiência cardíaca direita e uma síndrome da veia cava, são algumas das complicações que podem surgir ao longo da progressão da doença e, que podem dificultar a realização da terapêutica adulticida.

A maioria dos cães com infecções crônicas, desenvolvem uma glomerulonefrite. No entanto, é considerado que as lesões glomerulares originadas por *D. immitis*, raramente causam insuficiência renal. Apesar do risco acrescido, é sugerido o tratamento microfilaricida e adulticida destes animais, pelo simples facto da doença glomerular ter origem numa infecção por dirofilárias (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005).

A pneumonia alérgica desenvolve-se relativamente cedo no percurso da doença e, afecta 14% da população canina com dirofilariose (Atkins, 2003; Atkins, 2005). Calvert & Thomason (2008) referem que a pneumonia alérgica ocorre em 10% a 20% dos cães com infecções assintomáticas. A Granulomatose eosinofílica é uma complicação rara que ocorre em infecções ocultas (Calvert & Thomason, 2008). Uma trombose espontânea ou um tromboembolismo, estão associados à morte das filárias adultas e pode precipitar ou piorar os sinais clínicos, originando ou agravando a hipertensão pulmonar, a insuficiência cardíaca e, em casos raros, a hemoptise e o enfarte pulmonar.

A insuficiência cardíaca direita resulta de um aumento da resistência oferecida pelo ventrículo direito, secundário a uma doença arterial pulmonar crónica e a um tromboembolismo com hipertensão. A síndrome da veia cava é um tipo de apresentação da dirofilariose relativamente incomum, grave (Kitagawa, Kitoh, Ohba & Sasaki, 2003; Atkins, 2005). Na maioria dos estudos, é observada uma predisposição sexual, em que 75% a 90% desta síndrome afecta os machos e é caracterizada por uma carga parasitária exuberante (> 60 filárias, em que a maioria reside no átrio direito e na veia cava) e por um mau prognóstico (Kienle & Kittleson, 1998; Kitagawa et al., 2003; Atkins, 2005).

### **7.2. Terapêutica cirúrgica**

Ocasionalmente, é necessário recorrer à remoção cirúrgica das filárias em cães com ou sem síndrome da veia cava. A remoção cirúrgica das filárias está limitada a cães com um número exorbitante de filárias na artéria pulmonar. A remoção das filárias é comumente realizada por uma arteriotomia da artéria pulmonar, com o uso de uma sutura oclusiva em “bolsa de tabaco” ou por uma oclusão por insuflação e, em alguns caso pode ser usada uma atriectomia (Kienle & Kittleson, 1998).

Uma outra técnica, descrita por Sasaki, Kitagawa e Ishihara citado em Atkins (2005) consiste num método mecânico, para a remoção das filárias da artéria pulmonar, com o uso de um fórceps crocodilo flexível (Figura 14) ou com um *intravascular retrieval snare* (Kienle & Kittleson, 1998; Kitagawa et al., 2003; AHS, 2005; Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005). O fórceps é introduzido na artéria pulmonar, pela veia jugular, sendo guiado por um fluoroscópio (Kienle & Kittleson, 1998; AHS, 2005). Esta técnica tem sido aplicada em cães com um peso máximo de 5 kg. A taxa de recuperação destes animais varia entre 80% a 100% dos casos (Kienle & Kittleson, 1998; Ferasin & Knight, 2005).

**Figura 14.** Aspecto da remoção cirúrgica de filárias num Rotweiller com síndrome de veia cava usando um fórceps (Adaptado de LSU School of Veterinary Medicine)



A maioria dos cães tratados cirurgicamente, necessitam de uma administração subsequente de melarsomina (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005). A arteriotomia tem como vantagens, reduzir a incidência de uma toxicidade por arsénico e de complicações, como um tromboembolismo. Como desvantagem, são necessários, uma anestesia geral, um operador experiente, um fluoroscópio e uma subsequente administração de melarsomina. No entanto, é um potencial tratamento para cães com riscos acrescidos (Atkins, 2005).

### 7.3. Terapêutica microfilaricida

A eliminação das microfilárias é a segunda fase da terapêutica (AHS, 2005). Os cães com microfilárias devem ser submetidos ao tratamento de modo a controlar a disseminação da dirofilariose e reduzir o número de hospedeiros reservatórios (Kienle & Kittleson, 1998; AHS, 2005).

Actualmente, não existe um fármaco microfilaricida aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2003; AHS, 2005; Atkins, 2005). O único fármaco aprovado pela FDA é a ditiazanina iodada, que não se encontra no mercado Americano actualmente. O levamisol foi muito usado no passado, mas devido às suas complicações, a sua aplicação é rara presentemente (Kienle & Kittleson, 1998). Actualmente

as lactonas macrocíclicas, são as drogas microfilaricidas mais seguras e eficazes (Atkins, 2003; AHS, 2005; Atkins, 2005). As microfíliárias podem ser eliminadas rapidamente com ivermectina, na dose 50 µg/kg (8 vezes a dose preventiva), PO ou com milbemicina oxima, na dose preventiva de 500 µg/kg, PO (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2003; Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005).

A administração de lactonas macrocíclicas após o diagnóstico da doença é contraditória, devido ao risco de induzir resistência às lactonas macrocíclicas, sendo benéfico a sua administração seis meses após o tratamento adulticida, quando a apresentação clínica, não necessita de uma intervenção imediata (AHS, 2005; McCall et al., 2008). No entanto Atkins (2005) e Ferasin e Knight (2005) mencionam que a terapêutica microfilaricida deve ser instituída 4 a 6 semanas após a terapêutica adulticida e, Ware (2007) refere que deve ser apenas após 3 a 4 semanas, reduzindo assim, a concentração de antígenos através da eliminação das microfíliárias e das larvas migrantes, impedindo o crescimento de larvas imaturas e esterilizando as fêmeas adultas.

As microfíliárias podem também ser destruídas, mas a um ritmo lento, com ivermectina, moxidectina e selamectina, nas suas doses preventivas (Atkins, 2003; Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005). Seja de forma lenta ou rápida, há a eliminação das microfíliárias e esterilização das fêmeas adultas (Atkins, 2003; Atkins, 2005).

A administração mensal das lactonas macrocíclicas, facultava uma redução flexível do intervalo entre tratamentos, de modo a antecipar a eliminação das microfíliárias (AHS, 2005). O processo de destruição das microfíliárias pode ser acelerado, usando milbemicina nas doses recomendadas ou pela redução do intervalo das formulações tópicas ou orais, para duas semanas (Atkins, 2003; Atkins, 2005). Estes autores recomendam a testagem dos animais, pela técnica de Knott modificada ou pela técnica de filtração após 5 meses, ou após 2 a 3 doses de lactonas macrocíclicas. O AHS (2005), aconselha o início da profilaxia, após o animal ter sido testado com testes de pesquisa de antígenos, 6 meses após o tratamento.

### **7.3.1. Complicações do tratamento microfilaricida**

Após a administração das lactonas macrocíclicas na dose microfilaricida, podem ocorrer algumas complicações. A morte rápida de um número grande de microfíliárias em cães tratados com 50 µg/kg de ivermectina ou na dose profilática de milbemicina, 5% a 8% dos cães desenvolvem efeitos secundários (Atkins, 2005). Num estudo realizado em 126 cães com um número excessivo de microfíliárias na corrente sanguínea, observou-se que 6% manifestaram reacções adversas, à administração de ivermectina na dose microfilaricida (Atkins, 2003; Atkins, 2005). Os efeitos secundários mais comuns foram, vômito, diarreia, depressão, anorexia, hipotermia, letargia, inapetência, taquicardia, e raramente *shock* (Atkins,

2003; AHS, 2005; Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005; Ware, 2007). A diminuição destes efeitos pode ser obtida com a administração de corticosteróides (dexametasona na dose de 2 a 4 mg/kg IV) associada à fluidoterapia, permitindo uma recuperação em 12 horas (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2003; Atkins, 2005, Ferasin & Knight, 2005). Kienle & Kittleson (1998) aconselham a administrado inicial de levamisol, na dose de 2,5 mg/kg durante 3 a 7 dias, de modo a diminuir os efeitos adversos das lactonas macrocíclicas em cães com uma carga parasitária elevada. Num estudo, foi comprovado que a administração de prednisolona (1 mg/kg) em simultâneo com milbemicina, previne o aparecimento de reacções adversas (Kienle & Kittleson, 1998).

Cães com menos de 16 kg, com mais de 10,000 microfilárias por mililitro de sangue, estão sujeitos a desenvolver reacções adversas. A administração profiláctica de difenidramina (2 mg/kg, IM) e dexametasona (0,25 mg/kg, IV), previne a ocorrência de reacções adversas, numa terapêutica com lactonas macrocíclicas na dose microfilaricida (Atkins, 2003; Atkins, 2005).

Assim, Kienle & Kittleson (1998) recomendam que os animais devem ficar sob observação 6 a 8 horas após a terapêutica microfilaricida. O AHS (2005) e Ware (2007) mencionam que todos os cães que apresentam um risco acrescido, devem ficar sob observação nas primeiras 8 a 12 horas após o tratamento. Esta precaução, não é necessária nas administrações subsequentes, porque o número de microfilárias apresentar-se-á abaixo do nível crítico.

#### **7.4. Terapêutica suplementar**

##### **7.4.1. Corticosteróides**

As características inerentes dos corticosteróides (acção anti-inflamatória e imunossupressora) são vantajosas em alguns aspectos no tratamento da dirofilariose. A prednisona, o esteróide mais utilizado, reduz a arterite pulmonar, diminui o fluxo arterial pulmonar e reduz a eficácia da tiacertasamida, no entanto, piora a proliferação das lesões vasculares (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005; Calvert & Thomason, 2008) Por estas razões, os corticosteróides estão indicados na dirofilariose, não só face a complicações pulmonares parenquimatosa (pneumonia eosinofílica, granuloma eosinofílico e tromboembolismo pulmonar), como também para tratar ou prevenir as reacções adversas desencadeadas pelo tratamento microfilaricida e, possivelmente minimizar a reacção tecidual pela melarsomina. Numa pneumonia alérgica, deve ser administrado prednisona (1 mg/kg/dia), durante 3 a 5 dias descontínuos ou gradualmente como indicado. A prednisona também está indicada na manutenção de um tromboembolismo, na dose de 1 a 2 mg/ kg, SID, até a recuperação clínica e radiográfica, desde que o animal fique enclausurado numa jaula. Devido à retenção de fluidos, induzida pelos esteróides, é preciso ter precaução quando há uma insuficiência

cardíaca. O uso de corticosteróides reduz o fluxo sanguíneo pulmonar, agrava a proliferação da mioíntima e, actua com um pró-coagulante (Atkins, 2005).

O uso da combinação, Aspirina<sup>®</sup> com prednisolona é benéfico após a terapêutica adulticida, em que há redução da inflamação pulmonar e da formação de trombos. No entanto, esta combinação, podem originar hemorragias gastrointestinais nos cães, não sendo recomendada na prática clínica (Kienle & Kittleson, 1998).

#### **7.4.2. Aspirina<sup>®</sup>**

A aspirina, em Portugal e em outros países, é ainda um nome comercial registado, propriedade dos laboratórios farmacêuticos Bayer para o composto ácido acetilsalicílico. No entanto, é igualmente reconhecido como nome genérico do princípio activo, e é por esse nome que é habitualmente referida na literatura farmacológica e médica.

Os compostos anti-trombóticos tem vindo a ser alvo de atenção na terapêutica de manutenção da dirofilariose. Em seu benefício, reduzem a gravidade das lesões vasculares, a vasoconstrição da artéria pulmonar e a hipertensão pulmonar, induzida por tromboxanos e, minimizam a ocorrência de um tromboembolismo após a terapêutica adulticida. A aspirina proporciona a diminuição das lesões vasculares causadas pela morte das filárias, reduz a área e gravidade da proliferação da mioíntima causada pelas filárias vivas e diminui a progressão das doenças pulmonares parenquimatosas (Atkins, 2005). Este autor refere que em estudos recentes foram demonstram resultados contraditórios. Kienle e Kittleson (1998) indicam que a administração de aspirina, acarreta benefícios clínicos após a terapêutica adulticida, em cães com alterações graves na artéria pulmonar. Por outro lado, Ware (2007) não recomenda o seu uso.

Num estudo em cães com filárias implantadas experimentalmente, recebendo tratamento adulticida e aspirina, não foi observada qualquer melhoria a nível das lesões pulmonares, e apresentavam maior tortuosidade das artérias, que os cães de controlo e os que receberam heparina (Atkins, 2005). Por estas razões, o AHS (2005) não recomenda o uso empírico da aspirina, nem pelo seu efeito anti-trombótico nem pela redução da arterite pulmonar.

Quando usada, deve ser administrada diariamente durante 1 a 3 semanas antes do tratamento adulticida e durante 4 a 6 semanas após o tratamento. Em terapêuticas prolongadas com aspirina, o hematócrito e as proteínas totais, devem ser monitorizados periodicamente. Uso de aspirina deve ser evitado ou descontinuado em caso de hemorragias gastrointestinais (traduzidos por melena ou hematócrito baixo), emese, trombocitopénia (valores de  $50,000/\text{mm}^3$ ) e hemoptise (Atkins, 2005).



### 7.4.3. Heparina

Num estudo, com base no uso de heparina cálcica em doses baixas, no tratamento da dirofilariose canina, foi observado uma redução das reacções adversas associadas à tiacertasamida em cães em com sinais clínicos graves, incluindo insuficiência cardíaca.

Num estudo clínico, 75 cães considerados em elevado risco de desenvolver um tromboembolismo após a terapêutica adulticida, tratados com heparina (50 a 100 UI/kg, pela via SC, cada 8 a 12 horas), ou com aspirina ou indobufeno, demonstraram uma redução da gravidade e duração das complicações pós-terapêutica adulticida com o uso de heparina, em comparação com a aspirina ou o indobufeno. Apesar destes resultados, a heparina não é muito utilizada em cães com elevado risco de tromboembolismo (Kienle & Kittleson, 1998).

Atkins, (2005) e Calvert e Thomason (2008) recomendam o uso de heparina em casos de trombocitopénia ou hemoglobinúria, na dose de 75 a 100 UI/kg, por via SC, TID, durante uma semana.

Na Clínica do Funchal, na Sociedade Protectora dos Animais Domésticos (SPAD), onde decorreu parte do estágio curricular da autora, o protocolo terapêutico implementado é outro. Quando diagnosticado um cão com dirofilariose ou com uma possível infecção por *D. immitis*, o animal vai para casa medicado com Ananase<sup>®</sup> (Bromelaína) na dose de 2 mg/kg, PO, BID e, Aspirina<sup>®</sup> na dose 5 a 10 mg/kg, PO, SID. Após 15 dias com esta medicação, retorna à clínica para iniciar a terapêutica adulticida com Immiticide<sup>®</sup>. No 15º dia, é administrado um corticosteróide, Hostacortina<sup>®</sup> (acetato de prednisolona) na dose de 1 mg/kg, IM, associado ao Immiticide<sup>®</sup> na dose 2,5 mg/kg e, vai para casa com os donos, com a indicação de repouso absoluto. Volta no dia seguinte, para receber a segunda injeção de Immiticide<sup>®</sup> e é novamente recomendado repouso absoluto durante um mês e continuação da Aspirina<sup>®</sup> e do Ananase<sup>®</sup> até o fim da embalagem. Após 30 dias, volta à clínica para iniciar a terapêutica microfilaricida com Ivertin<sup>®</sup> a 1% (ivermectina) na dose de 10 mg em 1 ml por cada 25 kg, SC. Terminado o tratamento microfilaricida e adulticida, o animal só retorna à clínica 30 dias depois de concluído o tratamento microfilaricida, para confirmar a eficácia do tratamento, através das técnicas de Knott modificada ou de testes de pesquisa de antígenos.

## 8. Prognóstico

Os cães com infecções assintomáticas apresentam um bom prognóstico, contudo, cães com uma dirofilariose crónica, apresentam um prognóstico reservado. Uma vez iniciada a terapêutica adulticida, os sinais de uma dirofilariose crónica podem desaparecer. Assim, todos animais que desenvolvam CID, síndrome da veia cava, embolização maciça, granulomatose

eosinofílica, doença grave da artéria pulmonar e insuficiência cardíaca, apresentam um prognóstico reservado.

## **9. Profilaxia**

A profilaxia pode ser obtida através da intervenção sobre o hospedeiro, impedindo a maturação das microfilárias, ou sobre o vector, com o uso de insecticidas impedindo a transmissão da doença.

Um dos muitos insecticidas utilizados é o Pulvex<sup>®</sup> (composto por permetrina (40:60) 65%) com aplicação *spot on*. Outro método de prevenção, é com o uso da dietilcarbamazina ou das lactonas macrocíclicas, administradas via oral, tópica ou parenteral, diariamente, mensalmente ou semestralmente (Kienle & Kittleson, 1998; Glickman et al., 2006). A profilaxia é compreendida não só para uma protecção individual, mas também para reduzir a prevalência de infecção e a carga parasitária entre os cães, promovendo assim, uma diminuição do risco de transmissão pelo mosquito a cães sem qualquer protecção (Glickman et al., 2006).

A profilaxia deve ser iniciada entre a 6<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> semana de vida em zonas endémicas ou então, consoante as condições climáticas (Atkins, 2005; Ware, 2007; Calvert & Thomason, 2008). As falhas na prevenção são resultantes do desconhecimento por parte dos donos, da presença ou da potencialidade da doença, das omissões da administração por parte dos donos ou, por instruções inadequadas proporcionadas pelo veterinário, quanto às medidas preventivas (Atkins, 2005).

O AHS (2005) e Ware (2007) referem que a prevenção anual não é necessária em regiões de clima frio e, recomendam a administração um mês antes da época de transmissão e continuamente até um mês após da época de transmissão. Contudo, AHS (2005) menciona que em regiões onde a transmissão ocorre por mais de meio ano, a profilaxia sazonal não é o método mais indicado e, deve ser considerada uma profilaxia contínua. Atkins (2005) refere que a prevenção durante todo o ano deve ser realizada em qualquer área geográfica.

Em casos de falha de administração ou de alteração do método profilático, todos os animais devem ser testados 6 meses após e na próxima revisão anual. No entanto, de modo a garantir a eficiência dos produtos após uma falha na administração, o AHS (2005) recomenda que os animais devem ser testados aos 3 - 4 meses e aos 8 - 9 meses, em vez de ser aos 6 meses.

### **9.1. Dietilcarbamazina**

A dietilcarbamazina (DEC), foi por longo período o método de prevenção eleito, mas hoje em dia foi substituída pelas lactonas macrocíclicas (Atkins, 2005). Na dose mínima de 5,5 mg/kg/dia, a DEC previne a maturação das larvas no cão (Kienle & Kittleson, 1998). Segundo Calvert e Thomason (2008) a dose profiláctica varia entre 2,5 a 3,0 mg/kg, PO. Pensa-se que a DEC destrói as larvas L<sub>3</sub> e as L<sub>4</sub> migrantes (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005; Calvert

& Thomason, 2008). Apesar de ser um produto seguro e eficiente em animais amicrofilarémicos, apresenta uma janela terapêutica curta e por isso, tem de ser administrado diariamente, dificultando a adesão por parte donos (AHS, 2005; Atkins, 2005). A prevenção deve ser efectuada no início da época de transmissão, continuamente até 1 a 2 meses após o início do Inverno (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005).

A DEC só deve ser administrada a cães amicrofilarémicos, sendo assim necessário testar todos animais previamente, antes de iniciar a terapêutica preventiva (Kienle & Kittleson, 1998; AHS, 2005; Atkins, 2005). A administração da DEC a cães microfilarémicos, induz uma reacção adversa, possivelmente imunomediada em 30% dos casos. Segundo Kienle e Kittleson (1998), 15% a 86% dos cães microfilarémicos, desenvolvem reacções adversas quando tratados com DEC. Os sinais associados a esta reacção, ocorrem uma hora após a medicação e incluem, depressão, ptialismo, vômito, diarreia, pulso fraco, mucosas pálidas com um tempo de repleção aumentado e bradicárdia (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005; Ware, 2007). Subsequentemente, os cães podem dispneicos e taquicárdicos (Atkins, 2005).

Frequentemente, os donos inadvertidamente omitem uma ou mais doses de DEC. Quando é apenas omitido um dia, não há problema, no entanto, quando o esquecimento é maior, é recomendado a reinstituição da medicação e é preciso ter consciência, que uma infecção já pode estar instituída (AHS, 2005; Atkins, 2005).

## **9.2. Lactonas macrocíclicas**

As lactonas macrocíclicas são eficientes, seguras e convenientes como método profilático da dirofilariose, com vários espectros de acção e métodos de administração. As lactonas macrocíclicas, ivermectina (Heartgard<sup>®</sup>), milbemicina oxima (Interceptor<sup>®</sup>), moxidectina (ProHeart<sup>®</sup>), e selamectina (Revolution<sup>™</sup>), são os mais eficientes na prevenção da dirofilariose (AHS, 2005; Atkins, 2005). Estes compostos interrompem o desenvolvimento larvar das L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> e de filárias adultas durante os dois primeiros meses após a infecção, através de uma acção microfilaricida e esterilização das fêmeas (AHS, 2005; Atkins, 2005; Calvert & Thomason, 2008). Apesar destes compostos apresentarem uma acção protectora durante oito semanas, devem ser administrados consoante as instruções do fabricante (Atkins, 2005).

Calvert e Thomason (2008) recomendam que todos os animais submetidos a estes fármacos profiláticos, devam ser testados anualmente, devido às falhas na administração por parte dos donos e, devido à subdosagem, quando o animal está em crescimento.

## **9.3. Ivermectina**

A ivermectina (Heartgard<sup>®</sup>) é um químico derivado de uma mistura das avermectinas B<sub>1a</sub> e B<sub>1b</sub>, obtido da bactéria *Streptomyces* spp. (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005). As avermectinas actuam estimulando a acção pré-sináptica e pós-sináptica do ácido gamma-

aminobutírico (GABA) em alguns invertebrados. O GABA actua como um inibidor neurosináptico, bloqueando a estimulação pós-sináptica do neurónio adjacente, a transmissão motora nos nemátodes e, a transmissão neuromuscular nos artrópodes (Kienle & Kittleson, 1998). É eficiente contra um amplo espectro de endoparasitas e ectoparasitas e, é administrada mensalmente em doses preventivas (Atkins, 2005; Brown, Jacobson, Brandon & Martinod, 2006). Também existe associada ao pamoato de pirantel (Heartgard-30 Plus<sup>®</sup>), para melhorar a eficácia contra parasitas intestinais (Atkins, 2005; McCall, 2005; Calvert & Thomason, 2008).

A ivermectina é eficiente mesmo com lapsos de 2 meses na sua administração. A protecção é prolongada, com a administração continua por 12 meses após exposição, mesmo com omissões de 3 meses (98% de eficiência) e de 4 meses (95% de eficiência) (Atkins, 2005; McCall, 2005). A ivermectina é microfilaricida na dose preventiva (6 a 12 µg/kg/mês), promovendo uma redução gradual do número de microfírias (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005; Ware, 2007; Calvert & Thomason., 2008). Apesar da destruição gradual das microfírias, reacções adversas (e.g. diarreia) podem ocorrer, principalmente quando administrada a cães microfilarémicos (Atkins, 2005). Os resultados obtidos de um estudo realizado por McCall (2005) indicam que a ivermectina apresenta uma eficiência de 97,7% e de 95,1% contra filárias com 3 e 4 meses, respectivamente.

A ivermectina manifesta uma eficiência de 100% na prevenção de infecções por filárias. Atkins (2005) refere alguns estudos, que comprovam que a ivermectina apresenta propriedades parciais adulticidas, quando administrada continuamente por 16 meses.

Cunningham e Brandon (2006) desenvolveram uns implantes de silicone impregnados com ivermectina para aplicação subcutânea na região da espádua, como possível método profiláctico. A sua eficácia foi comprovada durante 365 dias após a sua administração em cães com uma carga parasitária elevada. Estes animais ao 365º dia apresentavam uma concentração no plasma de 0,15 a 0,64 µg/mL de ivermectina. Uma concentração de aproximadamente de 0,2 µg/mL no plasma, é considerada 100% eficaz, por isso, todos cães com concentrações superiores a 0,2 µg/mL estão protegidos. A concentração média de ivermectina no plasma neste estudo, foi de 3 a 7 µg/mL, permitindo a sua aplicação nos Collies.

#### **9.4. Milbemicina oxima**

Milbemicina oxima (Interceptor<sup>®</sup>) é um membro da família das milbemicinas (80% milbemicina A<sub>4</sub> e 20% milbemicina A<sub>3</sub>), derivada de uma espécie de *Streptomyces* (Atkins, 2005). Através de vários estudos comparativos, foi comprovado que a acção protectora e adulticida da milbemicina, não é tão eficaz quanto a de ivermectina (McCall, 2005).

Numa dose de 500 a 999 µg/kg, PO, é eficiente contra as larvas L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub> impedindo o seu desenvolvimento nas primeiras 6 semanas (Ferasin & Knight, 2005; Ware, 2007; Calvert & Thomason, 2008;). É administrada mensalmente e apresenta um efeito duradouro de dois meses. Quando administrada de modo contínuo durante 12 meses, o período de protecção pode expandir-se para três meses (97% de eficiência). Contudo, a sua eficácia decresce para 41% se existirem lapsos de 4 meses (Atkins, 2005). Na dose preventiva, a milbemicina é um desparasitante de amplo espectro, sendo eficiente também contra nemátodes da Família Ancylostomatidae e Trichuridae (Atkins, 2005; Calvert & Thomason, 2008). Quando administrada preventivamente a cães microfilarémicos, há uma grande probabilidade do desenvolvimento de reacções adversas, por ser um potente microfilaricida (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005). A administração de ivermectina na dose microfilaricida (50 µg/kg) associada à difenildramina (2 mg/kg, IM) e a dexametasona (0,25 mg/kg, IV), após a administração de milbemicina, pode prevenir a ocorrência de reacções adversas, principalmente em cães com uma carga elevada de microfilárias.

### 9.5. Moxidectina

A moxidectina (ProHeart 6<sup>®</sup>), é conhecida por apresentar um amplo espectro na prevenção da dirofilariose e demonstra ter uma eficácia de 100% e, ser segura na dose de 3 µg/kg, PO, durante 2 meses após a infecção (AHS, 2005; Atkins, 2005; Ware, 2007). Segundo Ferasin e Knight (2005) a dose varia entre 3 a 6 µg/kg. A moxidectina nesta dose, apresenta uma acção microfilaricida gradual e não induz reacções adversas quando administrada a cães ligeiramente microfilarémicos. Atkins (2005) demonstrou, que na dose de 15 µg/kg, o número de microfilárias é reduzido em 98%, 2 meses após o tratamento.

A moxidectina aparenta ser segura nos collies (Atkins, 2005). Existe uma nova fórmula liposomal da moxidectina (170 µg/kg), que permite uma maior flexibilidade na administração, e proporciona uma protecção durante 6 meses, com apenas uma injeção subcutânea (AHS, 2005; Atkins, 2005; Lock et al., 2005; Cunningham et al., 2006). Assim, com apenas duas administrações injectáveis confere uma protecção de 12 meses e, apresenta uma eficácia de 97%, mesmo com omissões de 4 meses no tratamento preventivo (Atkins, 2005). Porém, este produto foi removido do mercado nos Estados Unidos da América, por motivos de segurança e para estudos futuros, embora exista em outros países, como no Canadá, Itália e Austrália (AHS, 2005; Atkins, 2005; Glickman et al., 2006).

Existe também, uma solução em *spot on*, com aplicação tópica, composta por 10% de imidaclopride e 2,5% de moxidectina (Advocate<sup>®</sup>/Advantage Multi<sup>®</sup>). A sua administração mensal, proporciona o tratamento e a protecção contra pulgas, ácaros de sarna (*Sarcoptes scabiei* e *Otodectes cynotis*), nemátodes intestinais e *D. immitis* (Arther, Bowman, Slone &

Travis, 2005; Calvert & Thomason, 2008). Os resultados obtidos num estudo sobre uso de Advocate<sup>®</sup> na prevenção da dirofilariose, realizado por Arther et al. (2005) permitiram concluir, que a administração mensal de 10% de imidaclopride e 2,5% de moxidectina, numa dose de 0,1 ml/kg, é 100% eficaz na prevenção da dirofilariose.

#### **9.6. Selamectina**

A selamectina é uma lactona macrocíclica semi-sintética. Apresenta um espectro único, de aplicação tópica mensal. A sua eficácia é semelhante à das restantes lactonas macrocíclicas (Atkins, 2005; Ware, 2007). A sua aplicação tópica na dose 6 a 12 mg/kg, é preventiva contra a infecção pela *D. immitis*, contra pulgas e os seus ovos, ácaros de sarna (*Sarcoptes scabiei* e *Otodectes cynotis*) e carraças (Atkins, 2005; Ferasin & Knight, 2005; Ware, 2007). A exposição dos animais à água duas horas após a aplicação, não altera a sua eficácia. A selamectina, como as outras lactonas macrocíclicas, apresenta uma protecção de dois meses, apresentando uma eficiência de 99%, quando administrada de forma contínua durante 12 meses e, até mesmo com lapsos de 3 meses no tratamento profilático (Atkins, 2005).

#### **9.7. Avermectinas e Collies**

No início do ano 1980 foi documentada pela primeira vez, a sensibilidade dos cães de raça Collie à ivermectina. Nos Collies, foi identificado uma mutação no gene *ABCBI*. Esta mutação gera uma paragem prematura do codão no gene *ABCBI*, alterando a funcionalidade da proteína (P-glicoproteína (P-gp)). Estes cães apresentam um fenótipo semelhante ao *abcb1a* dos ratos, após a sua exposição à ivermectina. Os cães homozigóticos com uma deleção no gene *ABCBI*, exibem sinais neurológicos após uma dose singular de ivermectina ( $\geq 120 \mu\text{g/kg}$ ). No entanto, os cães heterozigóticos e homozigóticos com uma mutação no gene *MDR1* não manifestam qualquer sintomatologia na dose de  $120 \mu\text{g/kg}$ , mas podem desenvolver reacções secundárias com uma dose superior (ataxia, ptialismo e midríase). Estes cães também manifestam sensibilidade às outras lactonas macrocíclicas, como a milbemicina, selamectina e moxidectina, desenvolvendo sinais neurológicos. Mais tarde, esta mutação foi identificada em outras raças, como no Pastor Australiano, Pastor das Shetland e no Antigo cão de Pastor Inglês (Mealey, 2008).

Aparentemente as avermectinas conseguem passar a barreira hematoencefálica em pelo menos um terço dos Collies, causando problemas quando administradas em dose superiores às da dose preventiva (Kienle & Kittleson, 1998).

Com base em estudos científicos, a dose preventiva da ivermectina (6 a  $12 \mu\text{g/kg}$ ) e da milbemicina (500 a  $999 \mu\text{g/kg}$ ), é segura nos Collies (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins, 2005; Mealey, 2008). A milbemicina, para causar toxicidade nos Collies, tem de ser administrada numa dose superior a  $5 \text{ mg/kg}$ . Os Collies intoxicados podem vir a desenvolver ptialismo,

midríase, cegueira aparente, ataxia, bradicárdia e bradipneia, ao ponto de entrar num estado de coma e morrer (Atkins, 2005). A selamectina aprovada pela FDA, na dose preventiva (6 mg/kg), não causa toxicidade, mesmo em cães com um genótipo *ABCBI* (Mealey, 2008).

## LEISHMANIOSE

### 1. Etiologia e epidemiologia

A Leishmaniose é uma doença grave, crónica e zoonótica causada por um protozoário difásico do género *Leishmania* (Baneth, 2006; Mendão, 2009). Este parasita pertence ao Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Subordem Trypanosomatina e Família Trypanosomatidae (Moreno, Nieto & Hernández 1999).

Há cerca de 30 espécies diferentes de *Leishmania* dispersas pelos países do Velho Mundo e do Novo Mundo, e somente 20 são responsáveis pela infecção nos seres humanos. A incidência anual de pessoas infectadas com *Leishmania* é de 12 milhões, e 350 milhões de pessoas estão em risco de desenvolver a doença. Dos casos diagnosticados 1 a 1,5 milhões são da forma cutânea e 500,000 da forma visceral (Cardoso, Schallig, Neto, Kroon & Rodrigues, 2004; Roze, 2005; Baneth, 2006). Leishmaniose está subdividida em leishmaniose zoonótica, em que os canídeos são os principais reservatórios da infecção nos humanos, e em leishmaniose antroponótica, com transmissão de pessoa a pessoa através de flébotomos ou por outras vias (Baneth, 2006).

O género *Leishmania* é endémico em 88 países, em que 66 pertencem aos países do Velho Mundo (Sudoeste da Europa, Norte de África, Médio Oriente, Índia, Bengladesh e China) e 22 aos países do Novo Mundo (América Latina) (Lima-Netto, 2000; Roze, 2005; Baneth, 2006). No Sudoeste da Europa o principal agente etiológico da leishmaniose canina (LCan) é a *Leishmania infantum* (Moreno et al., 1999).

A prevalência da LCan em zonas endémicas está dependente das condições climáticas e do método de diagnóstico. A seroprevalência na Bacia do Mediterrâneo varia entre 10% e 37% (Baneth, Day, Roura & Shaw, 2005). Em Espanha, a incidência varia entre 8-9%, sendo muito elevada na zona de Andaluzia (5-34%), nas Ilhas Baleares (6-21%), na Catalunha (9-18%) e Castilha e León (10-15%) (Corrales & Moreno, 2006). Pereira (2008) menciona a existência três focos endémicos em Portugal, na Região de Alto Douro, Região Metropolitana de Lisboa e Algarve.

Num estudo desenvolvido por Cardoso e Mendão (2009), foram recolhidas 113 respostas do centro de atendimento médico-veterinário (CAMV) de 17 dos 18 distritos de Portugal Continental e também da Região Autónoma dos Açores (Ilha Terceira), não tendo sido

recebidas respostas somente do distrito de Castelo Branco e da Região Autónoma da Madeira. Neste estudo, relativamente ao número de casos de LCan observados durante os últimos 3 a 5 anos em 105 dos 113 CAMV, verificou-se que em 55,2% das respostas foi referido um aumento do número de casos, e em 36,2% que se mantiveram constantes.

A classificação do género *Leishmania* é tema de grande controvérsia e está em constante revisão (Fraile, Frisuelos & Miró, 2001; Roze, 2005; Baneth, 2006). O uso de apenas um critério, o morfológico torna difícil e incompleta a sua classificação (Roze, 2005). Actualmente a classificação das distintas espécies de *Leishmania* é em função da sua caracterização fenotípica e genotípica, com base na sequência de ADN, padrões de migração das isoenzimas (zimodemes), caracterização monoclonal de anticorpos e análise dos ácidos gordos. A técnica utilizada para este objectivo é a electroforese (Roze, 2005; Baneth, 2006). As populações que apresentam as mesmas isoenzimas denominam-se de zimodemes. Na Bacia do Mediterrâneo estão descritas no total 17 zimodemes de *L. infantum*. As espécies responsáveis pela maior parte dos casos, em seres humanos e em canídeos, pertencem ao zimodeme MON-1 e ocasionalmente MON-29, MON-33, MON-77. (Fraile et al., 2001). Nos países da Bacia do Mediterrâneo, o zimodeme MON-1 é o principal responsável pela LCan e leishmaniose visceral humana. Em Portugal foi também isolado o zimodeme MON-98 (Pereira, 2008).

Os principais agentes da LCan são a espécie *L. infantum*, que também é o principal agente da leishmaniose visceral no Homem, na Bacia do Mediterrâneo, Médio Oriente e América Latina e, a espécie *L. chagasi* na América do Sul (Baneth, 2006). Podemos observar na Tabela 4, a distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* nos países do Velho e Novo Mundos.



**Tabela 4.** Principais espécies de *Leishmania* (Adaptado de Tomás & Romão, 2008)

	<b>Espécie de Leishmania</b>	<b>Agente de leishmaniose canina?</b>	<b>Tipo de leishmaniose no Homem</b>	<b>Reservatório</b>
<b>Velho Mundo</b>	<i>L. infantum</i>	Sim	LV, LC	Cão
	<i>L. donovani</i>	Não	LV, LCPK	Homem
	<i>L. major</i>	Não	LC	Roedores
	<i>L. archibaldi</i>	Não	LV	Cão?
	<i>L. tropica</i>	Não	LC	Homem; cão/roedores?
	<i>L. aethiopica</i>	Não	LC, LCD	Damãs; roedores?
<b>Novo Mundo</b>	<i>L. chagasi</i> *	Sim	LV, LC	Cão
	<i>L. mexicana</i>	Não	LC, LCD	Roedores
	<i>L. amazonensis</i>	Não	LC, LCD	Roedores
	<i>L. panamensis</i>	Não	LC, LMD	Preguiças; cão/roedores?
	<i>L. peruviana</i>	Não?	LC	Homem; cão/roedores?
	<i>L. guyanensis</i>	Não	LC	Preguiças; roedores?
	<i>L. braziliensis</i>	Não?	LC, LMC	Cão/roedores?

Legenda: LV, leishmaniose visceral; LC, leishmaniose cutânea; LCPK, leishmaniose cutânea Pós- “Kala-azar”; LCD, leishmaniose cutânea difusa; LMC, leishmaniose mucocutânea

No Homem, no Velho Mundo a espécie *L. tropica* responsável pelo “Botão do Oriente” ocorre em algumas regiões do Médio Oriente, África e Sudoeste da Ásia, e é agente etiológico da leishmaniose cutânea em humanos (Baneth, 2006; Dujardin, 2008). A leishmaniose visceral ou “Kala-azar” (*L. donovani* no Homem) é frequente nas regiões asiáticas, na África e na América do sul e central (Lima-Netto, 2000). As espécies *L. braziliensis* e *L. mexicana* são os agentes da leishmaniose cutânea e mucocutânea da América Latina em Humanos (Rochette, 2003; Roze, 2005). O género *Leishmania* está dividido no subgénero *Leishmania* e *Viannia* (Baneth, 2006; Dantas-Torres, 2007).

## 2. Ciclo biológico

Na LCan estão descritos 3 ciclos epidemiológicos inter-relacionados mas com padrões de transmissão exclusivos, o ciclo silvático, ciclo peridoméstico ou rural e, o ciclo doméstico ou urbano (Moreno et al., 1999). O cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o hospedeiro natural e o reservatório de *L. infantum* (*L. chagasi*) (Baneth, 2006; Mendão, 2009). Para além do cão, várias espécies de canídeos selvagens, nomeadamente a raposa (*Vulpes vulpes*), chacal (*Canis aureus*) e lobo (*Canis lupus*), têm sido encontrados parasitados nos países do Velho Mundo por *L. infantum*, enquanto que no Novo Mundo, funcionam os reservatórios silváticos (Pereira, 2008; Sastre et al., 2008). Foram relatados casos de infecções em raposas em

Portugal, Itália e Espanha. Na Europa, estudos serológicos efectuado em raposas, revelaram uma prevalência de 16% a 60% em Portugal, 18% em Itália e 2,7% em Espanha (Sobrinho et al., 2008). Em Itália e Espanha o rato-negro (*Rattus rattus*) foi encontrado parasitado com *L. infantum*, apesar de ser apenas o hospedeiro secundário (Lima-Netto, 2000; Pereira, 2008).

O ciclo doméstico é mantido por cães domésticos e o ciclo peridoméstico por cães errantes e canídeos selvagens (e.g. a raposa), os quais parecem apresentar um sinantropismo progressivo (Moreno & Alvar, 2002; Pereira, 2008). Moreno e Alvar (2002) mencionam que a presença de um ciclo silvático independente do ciclo doméstico é pouco provável de ocorrer e, sugerem que deve ser considerado um ciclo peridoméstico.

Outros mamíferos como, os equinos, os bovinos, os caprinos, os ovinos e os felinos têm sido parasitados por *Leishmania* (Roze, 2005). Apesar de serem capazes de introduzir ou re-introduzir a infecção em outras áreas, não contribuírem significativamente para a sobrevivência, a longo prazo, da população de parasitas, daí serem hospedeiros secundários (Pereira, 2008).

As *sandflies* são dípteros que pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Família Psychodidae e Género *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Lima-Netto, 2000; Baneth et al., 2005; Roze, 2005).

Os flébotomos são pequenos insectos, com actividade nocturna, crepuscular, consoante a espécie e a época do ano (Baneth, 2006; Afonso & Alves-Pires, 2008). Os machos e as fêmeas são fitófagos, porém as fêmeas também são hematófagas para poderem efectuar as posturas. O número de refeições sanguíneas de uma fêmea, para completar o seu ciclo trofogónico, varia com as espécies e condições climáticas, mas, regra geral, é suficiente uma única refeição, observando-se uma concordância trofogónica. Em laboratório, as fêmeas *P. perniciosus* fazem uma refeição e morrem após a primeira postura. A duração do ciclo é variável, em função da temperatura, humidade e fotoperíodo. O ciclo de vida desenvolve-se no meio terrestre (formas pré-imaginais) e no meio aéreo (adultos) (Figura 15), sendo as preferências bióticas das formas imaturas, na Natureza, pouco conhecidas (Afonso & Alves-Pires, 2008).

As fases pré-imaginais são: ovo, larva (4 estados) e pupa. As larvas, nos diferentes estados, alimentam-se de matéria orgânica em decomposição, quer de origem animal, quer vegetal e, desenvolvem-se em locais abrigados com temperaturas estáveis. Na região do Paleártica, as formas larvares, no 4º estado, passam o Inverno em diapausa (Wall & Shearer, 1998; Afonso & Alves-Pires, 2008).

**Figura 15.** *Phlebotomus perniciosus* ♀  
(Adaptado de Afonso & Alves-Pires, 2008)

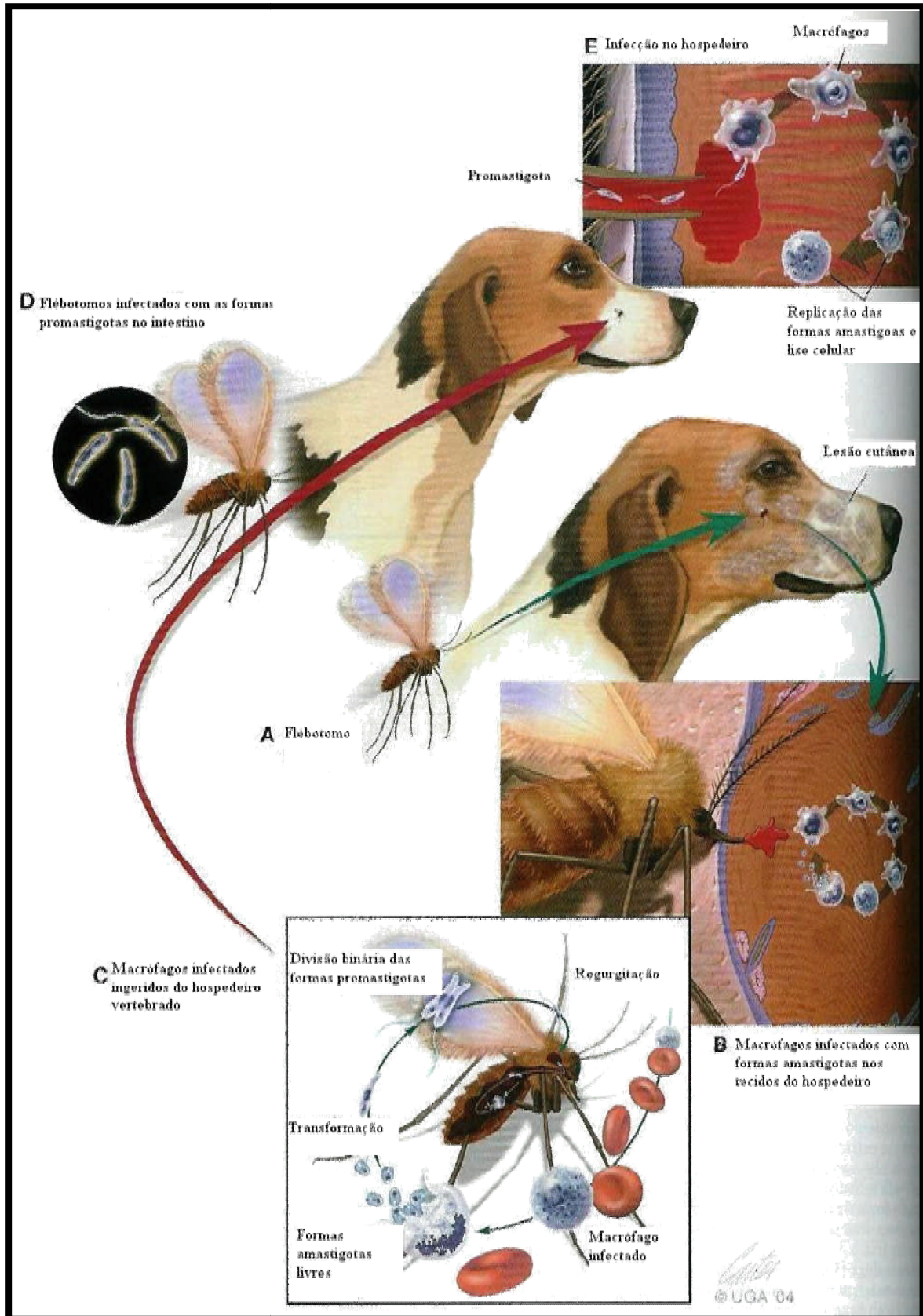


A existência de focos zoonóticos ou antroponóticos está limitada à presença do vector específico do parasita, à sua distribuição, à sua capacidade de dispersão, à existência de hospedeiros infectados e às condições climáticas (Afonso & Alves-Pires, 2008). Nas regiões do Mediterrâneo e Ásia, os flébotomos apresentam a sua actividade nos meses mais quentes (da Primavera ao Outono) (Baneth, 2006). No Mediterrâneo o período destes mosquitos pode iniciar-se em Março, com um pico de Julho a Setembro, podendo prolongarse até Outubro, em plena época de caça. Sendo mais abundantes em áreas rurais, zonas urbanas arborizadas e locais onde exista matéria orgânica em decomposição. Em Portugal a época de transmissão inicia-se em Março-Abril e termina em Setembro-Outubro (Afonso & Alves-Pires, 2008). Em Espanha ocorre entre Abril e Setembro, quando a temperatura e a humidade são favoráveis (Lima-Netto, 2000; Ramis, 2008). Na América latina, alguns flébotomos estão activos durante todo o ano (Baneth, 2006).

Diferentes espécies de vectores podem ser encontradas em várias áreas geográficas e nichos ecológicos. Algumas espécies transmitem exclusivamente uma espécie de *Leishmania*, embora haja vectores para mais de uma espécie (Baneth, 2006). Num estudo desenvolvido em Portugal por Cortes, Afonso, Alves-Pires e Campino (2007), foram identificados e quantificados os seguintes vectores: 392 (80,33%) *Phlebotomus perniciosus*, 93 (19,06%) *P. ariasi* e 3 (0,61%) *P. sergenti*. Em Portugal, Espanha e França os vectores responsáveis pela transmissão de *L. infantum* pertencem às espécies *P. perniciosus* e o *P. ariasi* (Lima-Netto, 2000; Corrales & Moreno, 2006; Cortes et al., 2007).

O insecto infecta-se ao ingerir sangue do hospedeiro vertebrado com macrófagos parasitados (Figura 16). Rapidamente os macrófagos são destruídos e libertam as formas amastigotas. Durante as primeiras horas depositam-se no intestino onde se multiplicam e diferenciam-se numa forma extracelular flagelada, promastigota e multiplicam-se activamente por divisão binária (Moreno et al., 1999, Baneth, 2006). Na fase final do ciclo sofrem diferenciação e transformam-se numa forma infectante, em promastigotas metacíclicas (Moreno et al., 1999, Roze, 2005, Oliveira, Jochim, Valenzuela & Kamhawi, 2009). O período necessário para que o ciclo se complete no insecto, oscila entre quatro a seis dias consoante a espécie de *Leishmania*, do vector e das condições ambientais (Moreno et al., 1999).

Figura 16. Ciclo biológico da leishmaniose canina (Adaptado de Baneth, 2006)

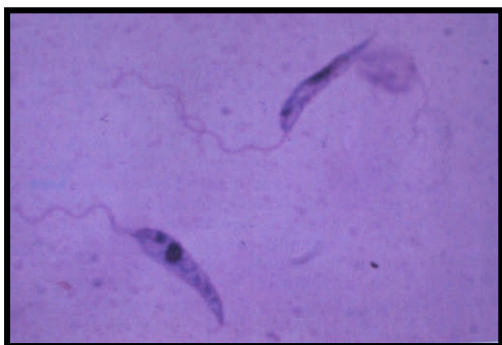


As formas promastigotas metacíclicas (Figura 17) são inoculadas no hospedeiro vertebrado através da picada do insecto (fêmea hematófaga). São posteriormente fagocitados por células

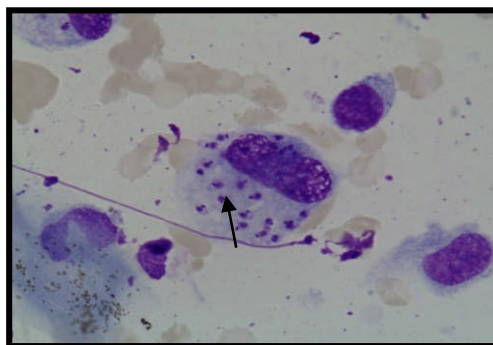
dendríticas e macrófagos da pele para o interior de um fagossoma ou vacúolo parasitóforo, onde em menos de 24 horas perdem o flagelo e diferenciam-se em amastigotas (Figura 18) (Moreno et al., 1999; Lima-Netto, 2000; Roze, 2005; Baneth, 2006).

Multiplicam-se activamente por divisão binária e eventualmente provocam a ruptura dos macrófagos. As formas amastigotas livres são depois fagocitadas por outros macrófagos, disseminando a infecção (Lima-Netto, 2000; Baneth, 2006).

**Figura 17.** Formas promastigotas da espécie de *Leishmania* (Adaptado de Baneth, 2006)



**Figura 18.** Formas amastigotas no interior de um macrófago, de uma citologia de uma punção de linfonodo (1000x) (fotografia original)



**Legenda:** Forma amastigota (seta)

Está demonstrado que a saliva dos insectos apresenta componentes anticoagulantes, vasodilatadores e, compostos imunomoduladores (acção na imunidade inata) e imunogénicos (resposta imunitária adquirida) (Roze, 2005; Kamhaki, 2009). Estudos em ratos comprovaram, que estes componentes estimulam uma resposta imunitária mediada por células, linfócitos Th<sub>2</sub> e inibe os linfócitos Th<sub>1</sub> (Roze, 2005).

Apesar da transmissão entre canídeos fazer-se através de um vector, já foram reportados casos em que a infecção foi transmitida sem a presença de um vector. Segundo Baneth et al. (2005), Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau e Ferrer (2008) e Silva et al. (2009) já foi documentada a transmissão vertical, de cadelas infectadas para o cachorro através da placenta. Silva et al. (2009) demonstrou pela primeira vez a transmissão sexual da LCan. A transmissão através de transfusão sanguínea, de partilha de seringas também tem sido referida (Baneth et al., 2005; Pereira, 2008)

### 3. Fisiopatologia

A relação parasita-hospedeiro estabelecida por *Leishmania* e o cão é complexa, pois está condicionada por uma grande variedade de factores, quer do hospedeiro como do parasita. Entre os factores dependentes do parasita, o mais importante é a espécie de *Leishmania* e dentro desta o zimodeme. Consoante o tipo de zimodeme, pode-se ter diferentes tipos de virulência e antigenicidade, condicionando assim a resposta do hospedeiro vertebrado. No

hospedeiro intervém dois factores, primário e secundário. Nos primários temos a constituição genética e directamente relacionada com esta, a capacidade de uma resposta imunitária, que condiciona a resistência ou a susceptibilidade à infecção. Os factores secundários, não menos importantes, são o estado sanitário e nutricional, que em grande medida são inseparáveis da capacidade imunitária, ao condicionar a fisiologia e da resposta geral do organismo (Moreno et al., 1999).

Em teoria, todas as raças são susceptíveis à infecção por *L. infantum* (Solano-Gallego et al., 2000; Alvar, Cañavate, Molina, Moreno & Nieto, 2004; Alves et al., 2009). No entanto Miranda, Roura, Picado, Ferrer e Ramis (2008) referem que as raças Pastor Alemão, Dobermann e Boxer, são mais susceptíveis à infecção. O resultado de um estudo recente realizado por Miranda et al. (2008) indica que as raças mais susceptíveis a serem infectadas são, o cão Pastor Alemão, Rottweiler e Boxer e, que não há predisposição sexual, apesar de alguns autores referirem que os animais do sexo masculino são mais afectados. A raça Podengo de Ibiza aparenta ter um certo nível de resistência (Solano-Gallego et al., 2000; Alvar et al., 2004; Alves et al., 2009). Nas Ilhas Baleares Espanholas, a incidência da LCan nesta raça é muito baixa em relação às restantes raças (Baneth, 2006). A resistência/susceptibilidade do hospedeiro sugere haver uma base genética e uma correlação significativa entre o complexo *major* de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II) e/ou o gene *Slc11a1* (*Nramp1*) (Sanchez-Roberto, Altet, Sanchez & Francino, 2005; Sanchez-Robert et al., 2008). O gene *Slc11a1* é um transportador de iões, que está envolvido na activação dos macrófagos e controlo da replicação de *Leishmania* no interior do fagossoma (Baneth et al., 2005; Sanchez-Robert et al., 2008).

O facto de um animal estar infectado e seropositivo não significa necessariamente que venha a desenvolver a doença activa (Moreno & Alvar, 2002; Pereira, 2008). Estudos epidemiológicos efectuados em focos endémicos de LCan indicam que cerca de 50% a 60% dos cães naturalmente infectados e seropositivos, não evidenciam sintomas da doença (Pereira, 2008). Apesar da influência de vários factores mencionados na Tabela 5, o curso da infecção é principalmente determinado pela natureza da resposta imunológica inata e adaptativa do hospedeiro (Mendão, 2009).

**Tabela 5.** Factores suspeitos de influenciar o curso da infecção de *Leishmania infantum* em cães (Adaptado de Mendão, 2009)

<b>Factores suspeitos de influenciar o curso da infecção da <i>L. infantum</i></b>
Resposta imunitária (determinação genética; resposta Th1 ou Th2)
Infecção concomitante e/ou doença (erliquiose, hepatozoonose, demodicose)
Imunossupressão ou terapia imunossupressiva
Idade (2-4 anos, $\geq$ 7 anos)
Estado nutricional
Infecções recorrentes
Virulência da estripe de <i>Leishmania infantum</i> isolada

Após a inoculação do parasita na pele do hospedeiro desenvolve-se uma reacção inflamatória localizada, em que participam as células polimorfonucleares (PMN) e as células do sistema mononuclear fagocitário (CSMF) (macrófagos, histiócitos e leucócitos) (Moreno et al., 1999; Roze, 2005; Baneth et al., 2005). Em poucas horas, forma-se um infiltrado de macrófagos na zona de inoculação, na sequência de algumas citocinas que possuem efeito quimiotáctico, dando início à fagocitose e à sua endocitose do protozoário (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

A infecção é estabelecida quando o parasita penetra no interior dos macrófagos e, resiste à acção microbicida. A entrada das leishmanias nos macrófagos ocorre por opsonização, regida pela interacção do factor C<sub>3</sub> do complemento, as moléculas presentes na membrana do parasita, a glicoproteína (GP) 63 e o lipofosfoglicano (LPG) e os receptores da membrana dos macrófagos. Uma vez no interior do vacúolo parasitóforo, a leishmania dispõe de mecanismos intrínsecos que lhe permitem resistir à acção das enzimas hidrolíticas lisossomais e aos radicais livres de oxigénio (RLO) (Moreno et al., 1999). Este comportamento de sobrevivência intracelular é conotado com os chamados “factores de virulência do parasita”, que resultam de moléculas particulares dos parasitas implicados nesse processo. Duas destas moléculas, são o LPG e a protease de superfície GP63, que degradam a maioria das enzimas hidrolíticas e inibem parcialmente a produção de RLO (Moreno et al., 1999; Alexandre-Pires & Correia, 2008). Porém, a espécie *Leishmania* possui determinadas enzimas (catalase e dismutasa de superóxido) que contradizem a acção dos RLO (Moreno et al., 1999).

Os macrófagos e as células dendríticas, são células de grande importância na modulação e regulação da resposta imunitária específica anti-leishmania. Estas células transportam os amastigotas da pele para os gânglios linfáticos, activando assim os linfócitos T, favorecendo uma resposta imunitária (Corrales & Moreno, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

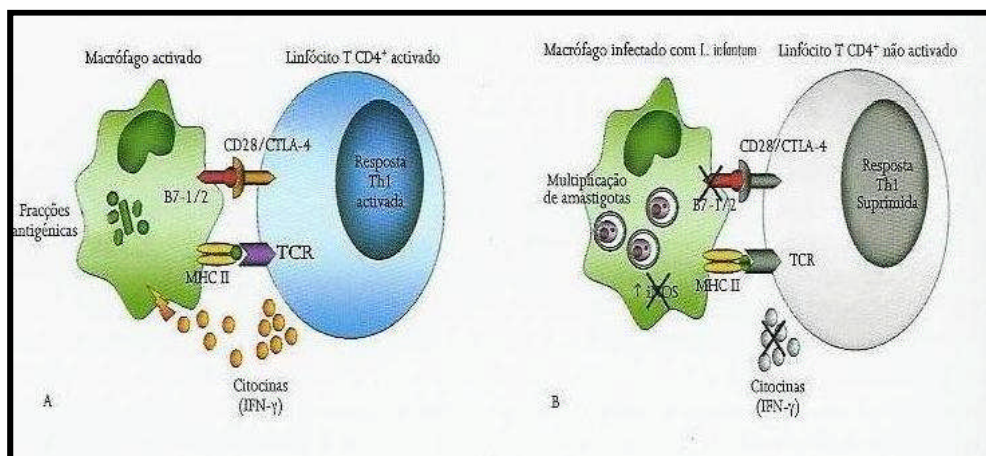
Nem todos os cães infectados naturalmente ou experimentalmente por *Leishmania* desenvolvem a doença. Os cães clinicamente resistentes são aqueles que contrariam a infecção através da sua resolução e eliminação dos parasitas, ou que são capazes de restringir a infecção ficando assintomáticos. Os animais predispostos a desenvolver a infecção e a doença clínica, são considerados animais susceptíveis (Baneth, 2006). O tipo de resposta imunitária desencadeada pelo hospedeiro mostra-se determinante na forma como a doença evolui. Assim sendo, em animais resistentes, os parasitas ficam localizados na pele ou em linfonodos eferentes, enquanto nos animais susceptíveis ocorre a multiplicação dos parasitas, ruptura das células infectadas, e disseminação do agente para vários órgãos, tais como o baço, os gânglios linfáticos, a medula óssea, o fígado, os rins e a pele (Moreno et al., 1999; Baneth et al., 2005; Baneth, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Num estudo recente realizado por Carrilo e Moreno (2009), em murinos com leishmaniose cutânea por *L. major*, define-se o paradigma Th1/Th2, em relação à resistência/susceptibilidade da infecção. A dicotomia da resposta imunitária contra o parasita, é determinada pelo envolvimento dos linfócitos T CD4+ e de citocinas reguladoras ou de sinalização, interferão  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina -4 (IL-4) respectivamente (Alvar et al., 2004, Corrales & Moreno, 2006; Carrilo & Moreno, 2009).

A resposta celular inicia-se com a acção das células apresentadoras de antígenos (APC). Os macrófagos apresentam os antígenos às proteínas de MHC-II da sua membrana externa (Figura 19). O MHC-II é reconhecido pelos receptores dos linfócitos CD4+, promovendo uma resposta em função da subpopulação de linfócitos. A dicotomia da resposta imunitária na leishmaniose, tem como base a heterogeneidade funcional das subpopulações de linfócitos Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>, descritas inicialmente em ratos e que posteriormente foi comprovada em outras espécies, incluindo o cão (Moreno et al., 1999).



**Figura 19.** Apresentação de fracções antigénicas do parasita pelo MHC-II de macrófagos aos linfócitos T (Adaptado de Santos-Gomes, Rodrigues & Marques, 2008)



**Legenda:** A- desenvolvimento de um conjunto de acções visando a activação da actividade leishmanicida; B- a redução de moléculas de co-estimulação dificulta o estabelecimento da comunicação entre as células e, conseqüentemente, a activação do macrófago.

A população de linfócitos cooperadores (Th, CD4+) são os principais responsáveis pelo mecanismo de activação das células efectoras, enquanto os linfócitos citotóxicos (Tc, CD8+) apenas têm papel secundário neste processo. Os linfócitos T CD4+ dividem-se em linfócitos Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>. Th<sub>1</sub> produz a interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12) e IFN-γ, induzindo uma resposta mediada por células e activando os macrófagos (Corrales & Moreno, 2006; Corrêa, Dossi, Vasconcelos, Munari & Lima, 2007). Os macrófagos são as células efectoras principais da resposta imunitária, por serem activados por várias citocinas (*e.g.* IFN-γ) para destruir intracelularmente os amastigotas de *Leishmania* (Moreno et al., 1999). Estas citocinas são produzidas pelos linfócitos T, células dendríticas, macrófagos e células *natural killer* (NK) e, induzem a síntese do óxido nítrico (NO) gerado pela sintetase induzida do óxido nítrico (iNOS) e superóxido (O<sub>2</sub>) por NADPH oxidase (Moreno et al., 1999; Alvar et al., 2004; Wilson, Jeronimo & Pearson, 2005; Alves et al., 2009). As células Th<sub>2</sub>, secretam IL-4, interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e factor β de transformação de crescimento (TGF-β) (Corrêa et al., 2007). Também promovem a proliferação de linfócitos B com produção de imunoglobulinas, condicionando assim, uma resposta imunitária humoral (Moreno et al., 1999).

Estudos elaborados em seres humanos e em ratos demonstraram que uma infecção resistente está associada a uma resposta imunitária mediada por células Th<sub>1</sub>, com produção de citocinas inflamatórias (IL-2, IFN-γ e Factor de necrose tumoral - α (TNF-α)), enquanto que em animais susceptíveis a resposta imunitária é do tipo humoral Th<sub>2</sub> com produção de citocinas reguladoras Th<sub>2</sub> (IL-4, IL-10 e TGF-β) (Baneth et al., 2005; Corrales & Moreno,

2006; Alves et al., 2009). Nos animais susceptíveis, os macrófagos estão funcionalmente alterados, afectando assim a sua função como APC e supõe-se que exercem uma actividade immunosupressora específica sobre os linfócitos Th<sub>1</sub>, devido à acção das citocinas IL-10 e TGF-β (Moreno et al., 1999; Corrêa et al., 2007). Corrêa et al. (2007) comparam a produção de TGF-β, IL-10 e IFN-γ no fígado e no baço de cães assintomáticos e sintomáticos e, comprovaram que a produção de TGF-β é mais elevada no baço, IL-10 no fígado, e que a IFN-γ era baixa em ambos os órgãos, sugerindo assim, que as citocinas relacionadas com uma resposta imunitária Th<sub>2</sub> inibem a produção de IFN-γ.

A inexistência de uma imunidade mediada por células é a chave da patogenia da doença e da sua progressão (Alvar et al., 2004). Estudos desenvolvidos por este mesmo autor permitiram confirmar que a immunossupressão específica contra o parasita é devida, parcialmente, à ausência de linfócitos T CD4+. Cães naturalmente infectados com *Leishmania* apresentam uma percentagem baixa de linfócitos CD4+ no seu sangue periférico, em relação aos animais saudáveis, estabelecendo assim, uma relação directa entre os níveis de linfócitos T CD4+ e uma resposta imunitária mediada por células (Alvar, et al., 2004). Miranda, Martorell, Costa, Ferrer e Ramis (2007), referem que vários autores detectaram alterações nos níveis das subpopulações de linfócitos circulantes na leishmaniose visceral. Segundo estas publicações, os cães infectados apresentam percentagens reduzidas de linfócitos CD4+ circulantes e do rácio CD4+/CD8+, que normalizam após o tratamento. No entanto, num trabalho desenvolvido por Miranda et al., (2007) evidenciou-se que não existe correlação clara entre as subpopulações de linfócitos em animais saudáveis ou infectados, não devendo assim ser utilizado este parâmetro para aferição da doença.

É possível que a resposta imunitária Th<sub>2</sub> seja determinada durante o período de incubação. Este factor é determinante para a progressão da infecção e para o aparecimento dos sintomas clínicos (Alvar et al., 2004). Segundo Alvar et al. (2004) estudos em infecções experimentais em cães, indicam que durante grande parte do período de incubação não há resposta imunitária definida. No entanto, mesmo antes do aparecimento de qualquer sintoma desenvolve-se uma resposta imunitária Th<sub>1</sub>, que não impede o desenvolvimento da doença, mas que desaparece uma vez estabelecida a doença clínica.

A LCan é uma doença crónica, em que os sintomas clínicos só se manifestam entre 3 meses a 7 anos após infecção (Baneth, 2006). A imunidade mediada por células gera uma reacção inflamatória do tipo proliferativo, um infiltrado celular composto por macrófagos, linfócitos e células plasmáticas. Este tipo de lesões desenvolvem-se especialmente no fígado, rins, pele, aparelho digestivo e reprodutor. As alterações degenerativas afectam principalmente os

órgãos hematopoiéticos e linfóides, em que a degeneração hipoplásica progressiva é uma das causas da anemia (Moreno et al., 1999).

A resposta humoral própria dos animais susceptíveis, também deriva de mecanismos imunopatogénicos, causados por auto-anticorpos e por complexos imunes (Moreno et al., 1999). A produção de anticorpos específicos inicia-se nas primeiras semanas da infecção e seguem uma cinética crescente, que de tal forma passadas 8 a 12 semanas, podem apresentar níveis séricos exuberantes. Numerosos estudos reportaram a existência de uma cinética entre a distribuição das classe de imunoglobulinas em respostas serológicas de cães naturalmente ou experimentalmente infectados. Está claro, que em infecções sintomáticas apresentam títulos elevados de anticorpos das classes IgG, IgE e IgA, consistente com uma resposta imunitária do tipo Th<sub>2</sub>. Contudo, devido à grande divergência entre autores, não é possível estabelecer uma relação directa entre o nível de anticorpos e o estado clínico dos animais infectados (Moreno et al., 1999; Day, 2007; Alves et al., 2009).

Os animais infectados devido a uma estimulação policlonal dos linfócitos B, produzem exacerbadamente imunoglobulinas específicas ou inespecíficas e auto-anticorpos (Moreno et al., 1999; Baneth et al., 2005). Estes processos estão associados aos casos de miocardite, dermatomiosite, alterações hepáticas, renais e vasculares, anemia e leucopénia (Moreno et al., 1999). A excessiva produção de anticorpos provoca lesões celulares e nos tecidos, através de mecanismos de hipersensibilidade do tipo II e III (Baneth et al., 2005). Consequentemente, formam-se imunocomplexos circulantes (CIC) compostos principalmente por IgG e pelas seguintes fracções de complemento, C1, C2 e C4, que se desenvolvem em diferentes locais do organismo (Alvar et al., 2004; Corrales & Moreno, 2006). Os CIC alteram a capacidade fagocitária dos monócitos e neutrófilos circulantes, interferindo no mecanismo de agregação plaquetária e na produção de amins vasoactivas. Porém, os depósitos de CIC no endotélio vascular, dão lugar a uma reacção de hipersensibilidade do tipo III, em que a activação do sistema complemento e a actuação das células inflamatórias, provocam alterações na permeabilidade vascular e fenómenos de necrose tecidual (Moreno et al., 1999). No cão, a deposição de CIC no rim pode levar a uma falha renal, sendo esta a principal causa da morte de cães com leishmaniose (Baneth, 2006). Cães infectados com pouca ou nenhuma resposta imunitária humoral, não desenvolvem lesões renais (Alvar et al., 2004).

A LCan está associada a vários tipos de lesões cutâneas disseminadas (Baneth, 2006). Estas lesões cutâneas estão comumente associadas a diversas respostas imunitárias. Numa resposta imunitária Th<sub>1</sub>, a lesão mais característica é uma dermatite, que está associada à presença das células de Langerhans e queratócitos, que expressam o MHC-II, linfócitos T, macrófagos e parasitas na derme. Numa resposta imunitária Th<sub>2</sub>, as lesões nodulares sem

apresentação de células e macrófagos parasitados, são as mais comuns. Os fibroblastos parasitados da pele, podem ser importantes no desenvolvimento de úlceras (Alvar et al., 2004).

#### **4. Quadro Clínico**

Os sinais clínicos e a altura em que se manifestam variam amplamente, desde a ausência de sintomas a uma síndrome clínica grave. A manifestação clínica da LCan é muito variável, devido à multiplicidade dos mecanismos patogénicos e das respostas imunitárias individuais (Moreno et al., 1999; Lima-Netto, 2000). Segundo Alexandre-Pires e Correia (2008) após a infecção, decorre um período de incubação até ao aparecimento dos primeiros sintomas, que é considerado por vários autores bastante longo, podendo variar entre um mês e dois anos.

Moreno et al. (1999) e Alvar et al. (2004) classificam a LCan em três quadros, agudo, subagudo e crónico ou latente regressivo. Contudo, são raros os casos com quadros agudos e subagudos (20%) (Moreno et al., 1999). Também podem ser classificados de acordo com os sintomas clínicos, em polissintomáticos, oligossintomático e assintomático (Alvar et al., 2004). Tanto os cães assintomáticos como os sintomáticos podem constituir uma fonte de infecção para os flebotomos (Guarga et al., 2000; Mendão, 2009). Sob condições experimentais os cães sintomáticos provaram ser quatro vezes mais infecciosos para os flebotomos, do que um cão oligossintomático ou assintomático (Mendão, 2009). Nas Ilhas Baleares, Marselha, França e a Grécia, a prevalência de cães assintomáticos é elevada, variando entre 70-80%. Quase todos ou mesmo todos os animais que residem nestas áreas, estão infectados durante toda a sua vida (Baneth, 2006).

As formas progressivas, de curso crónico e com implicação viscerocutâneas, são as apresentações mais frequentes na Bacia do Mediterrâneo (Moreno et al., 1999).

##### **4.1. Período inicial**

Existem poucos estudos sobre os sinais no início da doença (Alvar et al., 2004). A informação existente baseia-se fundamentalmente em infecções experimentais, já que em infecções naturais, numa fase inicial, os sinais são inespecíficos (Moreno et al., 1999). Estes estudos mostram grandes diferenças, não só quanto aos sinais iniciais da doença, como também no período latente e na progressão da doença. Geralmente, não existe uma sintomatologia precisa nesta fase, podendo assim variar, entre alterações inespecíficas com início insidioso e um desenvolvimento progressivo (Moreno et al., 1999; Alvar et al., 2004). Perda de peso, astenia, apatia e em ocasionalmente anorexia e febre, são alguns dos sinais inespecíficos desta fase (Moreno et al., 1999).

A partir do terceiro mês é possível observar sinais cutâneos, conjuntivite e dor renal à palpação. Outros autores dizem que os sintomas hemorrágicos (epistáxis) são os primeiros a surgir (Alvar et al., 2004).

#### **4.2. Período patente**

Caracteriza-se por diversos sintomas com grande variabilidade de intensidade, consoante a evolução da doença, que de tal maneira, determinados sintomas podem ser mais predominantes em alguns animais do que em outros (Moreno et al., 1999). A maioria dos cães infectados exibe uma sintomatologia característica da doença, contudo, pode não se manifestar da mesma maneira em todos os animais (Alvar et al., 2004). A sintomatologia característica desta fase, consta de sintomas inespecíficos, linfadenopatia e alterações cutâneas (Moreno et al., 1999). Nos sintomas inespecíficos verifica-se hipertermia, apatia, astenia, anorexia, polidipsia e perda de peso. A linfadenopatia generalizada manifesta-se por um aumento do tamanho e consistência dos gânglios linfáticos superficiais, especialmente dos poplíteos, pré-escapulares e sub-maxilares (Moreno et al., 1999). Hepatomegália e esplenomegália também são comuns nesta fase (Alvar et al., 2004).

Existe uma abundante variedade de lesões cutâneas, que podem surgir desde pequenas alopecias com descamação seca, descamação seborreica, às mais ou menos extensivas úlceras crostosas. Estas lesões cutâneas não pruriginosas, inicialmente estão limitadas à zona da face, orelhas, em redor do nariz e zona peri-ocular e, subsequentemente, disseminam-se por todo o corpo, especialmente nas zonas onde os ossos são mais proeminentes. De acordo com vários autores, pelo menos 90% dos cães sintomáticos manifestam um quadro cutâneo (Alvar et al., 2004).

Através de um estudo realizado por Alvar et al. (2004), foi possível classificar as lesões cutâneas em quatro grupos: (i) Alopecia e descamação, no qual 60% dos cães apresentavam inúmeros amastigotas nos macrófagos da pele; (ii) Dermatite ulcerativa, com poucos amastigotas na pele dos joelhos e articulações (23% dos animais); (iii) Dermatite nodular, caracterizada por pequenos nódulos com macrófagos parasitados (11% dos casos); (iv) Dermatite pustular (6%).

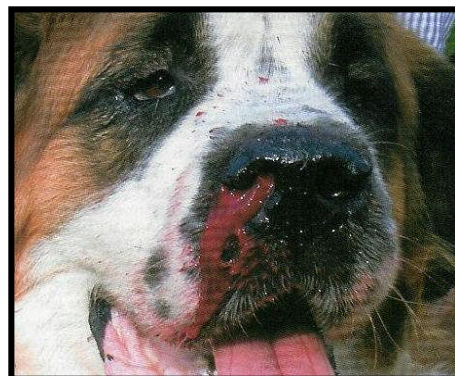
Aproximadamente 20% a 40% dos cães diagnosticados com leishmaniose visceral manifestavam lesões oculares, tais como, queratoconjuntivite e uveíte linfoplasmocítica ou granulomatosa (Baneth, 2006). Conjuntivite mucosa ou mucopurulenta com secreção amarela são frequentes na LCan (Figura 20) (Alvar et al., 2004). Ocasionalmente, também são observados casos de blefarites, queratites e uveítes (Moreno et al., 1999).

As lesões nasais são igualmente variáveis na natureza, duração e intensidade, podendo ir de uma rinite serosa com fluxo não muito abundante, mas contínuo, a uma rinite mucopurulenta. A epistáxis parece estar associada a lesões inflamatórias da mucosa nasal e, pode surgir na forma uni ou bilateral, mas com intensidade variável (Figura 21) (Moreno et al., 1999; Baneth, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

**Figura 20.** Conjuntivite num cão com uveíte (Adaptado de Baneth, 2006)



**Figura 21.** Epistaxis unilateral (Adaptado de Baneth, 2006)



Com o progredir da doença, o animal pode desenvolver uma atrofia muscular, como também, uma onicogribose (Figura 22). Ataxia, paralisia, parésia, convulsões e neuralgia, são alguns dos sintomas manifestados pelos cães, quando o sistema nervoso está afectado. Estão descritos alguns casos de osteomielite e artrosinovite (Alvar et al., 2004).

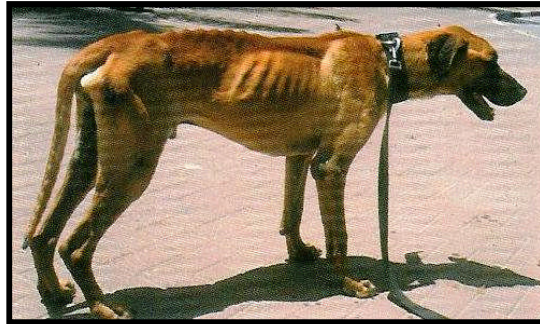
#### **4.3. Período final**

Neste período, a sintomatologia pode manifestar-se entre dois a três anos ou, até mesmo vários anos após a infecção. Nesta fase, a maioria dos órgãos estão afectados e apresentam úlceras e alopecias disseminadas pelo corpo inteiro. Os cães apresentam-se edemaciados ou até mesmo caquéticos (Figura 23) e morrem devido à insuficiência renal e hepática (Alvar et al., 2004). Devido ao mau estado geral do animal ou a estados imunossupressivos, podem surgir co-infecções, tais como, erliquiose, riquetsioses, hepatozoonose, demodicose, babesiose e neosporose (Baneth et al., 2005; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

**Figura 22.** Onicogrifose num cão com LCan (Adaptado de Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008)



**Figura 23.** Animal com caquécia, atrofia muscular (Adaptado de Baneth, 2006)



## 5. Lesões

A base do quadro lesional de todos os órgãos afectados, é um processo reactivo que se pode considerar como padrão lesional da leishmaniose. Caracteriza-se por uma reacção inflamatória crónica proliferativa, com um infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, linfócitos e células plasmáticas. Dispõem-se de forma difusa ou formam microgranulomas pouco organizados, em conjunto com processos degenerativos e necróticos. As lesões mais importantes afectam os rins, fígado, órgãos linfóides e a pele (Moreno et al., 1999).

### 5.1. Lesões renais

Em 23% dos casos de LCan, as leishmanias localizam-se nos rins, levando à formação de uma nefropatia crónica proliferativa que afecta os glomérulos, túbulos e o tecido intersticial (Moreno et al., 1999; Alexandre-Pires & Correia, 2008). Primeiramente, podemos observar lesões degenerativas e necróticas das células dos túbulos renais, causando uma nefrite tubular. As lesões glomerulares surgem mais tarde e podem manifestar-se de formas diversas. A lesão glomerular mais comum na LCan, é a glomerulonefrite membranosa proliferativa e, caracteriza-se pelo espessamento da membrana basal glomerular, por depósitos de hialina (ocasionalmente amilóide) e pela proliferação de células endoteliais e mesangiais. Em estudos imunohistoquímicos evidenciou-se a participação de imunocomplexos neste processo (Moreno et al., 1999).

Estudos em cães com leishmaniose revelaram a existência de imunocomplexos circulantes depositados glomérulos renais em todos os animais. Pensa-se que a fixação destes CIC na membrana basal, deve-se à existência, de locais aniónicos passíveis de fixar moléculas carregadas positivamente, como é o caso dos imunocomplexos (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Os imunocomplexos só se fixam à membrana basal dos glomérulos quando ficam cationiônicos por anticorpos antinucleares (ANA), como é o caso das anti-histonas, ou quando são formente catiónicos (Ginel, Camacho & Lucena, 2008). Outra lesão renal muito comum na leishmaniose, é a nefrite intersticial difusa, em que há formação de edema e presença de um infiltrado celular (Moreno et al., 1999).

Estas lesões podem evoluir e levar a uma insuficiência renal crónica ou a um síndrome nefrótico, com aumento da ureia e creatinina no sangue e proteinúria grave (Blavier et al., 2001; Corrales & Moreno, 2006).

## **5.2. Lesões hepáticas**

A lesão típica neste órgão, consiste numa inflamação crónica proliferativa, que afecta toda a sua estrutura (Melo et al., 2008). Em exame histológico, estas lesões iniciais são de uma hepatite aguda serosa com edema inflamatório, hemólise intravascular e hiperémia passiva na zona centrolobular (Alexandre-Pires & Correia, 2008). Em fases mais avançadas os fenómenos proliferativos aumentam, promovendo a formação de um infiltrado intenso que pode tornar-se difuso (composto por linfócitos, células plasmáticas e macrófagos com ou sem amastigotas ou microgranulomas, ocasionando uma hepatite granulomatosa (Melo et al., 2008). Há também uma hipertrofia e hiperplasia das células de Kuppfer, em cujo citoplasma se observam formas de *Leishmania* (Melo et al., 2008; Giunchetti et al., 2008). Os granulomas intralobulares são compostos por linfócitos, células plasmáticas, histiócitos e ocasionalmente células epitelóides (Melo et al., 2008; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Alterações vacuolares do citoplasma, tumefacções mitocondriais e focos de esteatose, são processos degenerativos, que podem dar início a fenómenos de necrose celular e originar uma hepatite necrótica centrolobular (Moreno et al., 1999; Alexandre-Pires & Correia, 2008). Todas estas lesões hepáticas conduzem a um aumento das enzimas hepáticas e, à manifestação de uma sintomatologia típica consistente com vómitos, perda de peso, poliúria e polidipsia, ascite entre muitos outros (Corrales & Moreno, 2006).

## **5.3. Lesões esplénicas**

Num estudo em baços de cães infectados com leishmaniose visceral, foi comprovado uma profunda modificação na estrutura microvascular e imunológica dos mesmos (Alexandre-Pires & Correia, 2008). As lesões mais importantes ocorrem na polpa branca, em que há uma depleção linfocitária com redução, atrofia e inclusive destruição dos folículos linfóides. Na zona marginal evidencia-se uma hiperplasia das células reticulares em redor das artérias peniciladas. Na polpa vermelha surgem fenómenos de hiperémia e microhemorragias, e uma



hiperplasia muito marcada das fibras reticulares nos cordões esplénicos, que desorganiza a sua estrutura (Moreno et al., 1999).

Numa fase crónica, o baço apresenta-se atrofiado e com consistência aumentada e, a sua cápsula fica espessada. Pode-se também observar uma infiltração dos folículos linfóides por plasmocitoblastos e plasmócitos, enquanto que nos centros germinativos ocorrem fenómenos de linfocitólise. A polpa branca sofre atrofia e surge proliferação de histiócitos que contêm leishmanias no citoplasma. Nalguns pontos observa-se esclerose (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

#### **5.4. Lesões linfonodulares e medulares**

Podemos afirmar que a hipertrofia dos linfonodos é alteração mais comum (Alexandre-Pires & Correia, 2008). Os linfonodos ficam hipertrofiados, com 2 a 6 vezes o seu tamanho normal, lisos, indolores e com consistência aumentada (Roze, 2005; Baneth, 2006). Esta alteração pode afectar apenas um linfonodo, contudo, é mais comum haver uma linfadenomegália generalizada (Roze, 2005; Baneth, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Numa fase inicial, surgem fenómenos hiperplásicos, com hipertrofia dos folículos linfóides e presença abundante de células linfóides blásticas nos centros germinativos (Moreno et al., 1999; Alexandre-Pires & Correia, 2008). Nas zonas paracorticais e cordões medulares surge uma reacção proliferativa dos macrófagos, ocorrendo mobilização das células reticulares, cujo citoplasma está repleto de leishmanias, verificando-se um aumento no número de plasmócitos e diminuição do número de linfócitos (Alexandre-Pires & Correia, 2008). Na zona cortical, ocorre uma desorganização dos folículos linfóides, gerada por fenómenos de hiperplasia, hipertrofia ou até mesmo destruição dos folículos linfóides (Moreno et al., 1999; Giunchetti et al., 2008). Numa fase avançada, predominam os processos de linfocitólise, a nível dos centros germinativos e intensa plasmocitose a nível medular (Giunchetti et al., 2008; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Alexandre-Pires e Correia (2008) mencionam que as alterações macroscópicas da medula óssea permitem evidenciar uma consistência mais fluida do que o normal. Estes mesmos autores, referem que a nível microscópico, surge uma mielopatia involutiva e não regenerativa, com depleção das séries eritroblásticas, leucoblásticas e megacarioblásticas, aumento do número de plasmócitos e deposição de hemosiderina. Forma-se ainda, granulomas ricos sem macrófagos, gránulocitos e linfócitos T.

#### **5.5. Lesões cutâneas**

O quadro lesional cutâneo é muito amplo e está classificado em quatro formas clínicas: queratoseborreica, ulcerativa, nodular e pápulo-pustulosa (Corrales & Moreno, 2006; Fraile et

al., 2001). A forma queratoseborreica caracteriza-se pela aparição de áreas simétricas de alopecia e descamação seca difusa, não pruriginosa. Estas lesões ocorrem em pelo menos 90% dos casos e apresentam uma distribuição pela cabeça (região periorbital, focinho e pavilhões auriculares), saliências ósseas, extremidade dos membros e ponta da cauda. O pêlo apresenta-se baço e quebradiço. Com a cronicidade das lesões forma-se uma inflamação purulenta da pele, com eritema e dor. A pele sofre um aumento da espessura, nas zonas de alopecia, nas faces e nas almofadinhas plantares, tornando-se pouco elástica, dura, acinzentada e rugosa (Rochette, 2003; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

A forma ulcerativa é também conhecida por outros autores como dermatite ulcerativa. Nesta, há formação de úlceras cutâneas que estão revestidas por crostas amareladas, sem tendência para a cicatrização (Carvalho & Santos, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008). Localizam-se predominantemente nas extremidades dos membros, articulações, almofadas plantares, pavilhões auriculares, pálpebras e focinho (Rochette, 2003).

A forma nodular (dermatite nodular) resume-se ao aparecimento de nódulos cutâneos em todo o corpo, sendo mais predominante no toráx, abdómen e nos pavilhões auriculares (Carvalho & Santos, 2006). Estes nódulos, por vezes não ulcerados, que variam de alguns milímetros a 10 cm de diâmetro, não pruriginosos e indolores, são muito característicos em algumas raças, incluindo Rottweiler, Boxer e Dobermann (Fraile et al., 2001; Rochette, 2003; Corrales & Moreno, 2006). Histologicamente, os nódulos correspondem a granulomas e são formados por macrófagos, células gigantes, alguns linfócitos e células plasmáticas e, um grande número de parasitas (Blavier et al., 2001). Uma lesão nodular conhecida por “cancro de inoculação” aparece, por vezes no local da picada do flébotomo, na ponta do nariz ou na face interna do pavilhão auricular (Blavier et al., 2001; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

A forma pápulo-pustular (dermatite pustular) é a menos frequente de todas elas. Consiste numa erupção generalizada, não pruriginosa, cujas lesões assemelham-se a uma foliculite bacteriana, com pústulas estéreis (Fraile et al., 2001; Corrales & Moreno, 2006). Localizam-se essencialmente no tronco, abdómen, axilas e bragadas (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Em todas as formas há um intenso infiltrado inflamatório (macrófagos, linfócitos e células plasmáticas, ocasionalmente neutrófilos) que atinge a derme e o tecido subcutâneo. O infiltrado inflamatório difuso, provoca alteração nos folículos pilosos, glândulas sebáceas e estruturas vasculares (Moreno et al., 1999).

O focinho apresenta, geralmente hiperqueratose, despigmentação e aspecto seco e fendilhado. Há uma hipertrofia ungueal (onicogribose) por colonização da matriz ungueal pelo parasita e por hipersensibilidade das almofadas plantares, que dificulta do desgaste normal das unhas (Carvalho & Santos, 2006; Aguiar et al., 2007; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

## **5.6. Lesões oculares**

De acordo com Roze (2005), as lesões oculares ocorrem em 25% dos casos. As lesões oculares são polimórficas, sendo algumas muito discretas. Porém, qualquer tecido do globo ocular pode ser afectado (Moreno et al., 1999; Alexandre-Pires & Correia, 2008). As lesões oculares podem surgir isoladamente (38% dos casos) ou associadas a outros sinais clínicos da LCan em 62% dos casos (Roze, 2005). As lesões mais frequentes são as conjuntivites, blefarites, queratites e uveites, podendo afectar o aparelho ocular de forma unilateral ou bilateral. Em alguns estudos, as lesões oculares podem surgir por acção do parasita ou por processos imunológicos. Assim, a produção de imunoglobulinas pode levar à formação de depósitos de complexos imunes, provocando reacções inflamatórias (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Nas formas avançadas da patologia ocular, podem surgir várias complicações, tais como, úlceras, querato-conjuntivite seca, atrofia da íris, glaucoma, exoflamia, distrofia corneal e panoftalmite (Roze, 2005; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

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

As lesões do aparelho locomotor baseiam-se em claudicações, enfraquecimento dos membros e, num quadro profundo de astenia e depressão. A nível muscular, surge uma atrofia generalizada com emagrecimento, caquexia, demarcação saliente das estruturas ósseas, atrofia marcada dos músculos da cabeça (massetér e temporais), dando uma aparência de “cabeça velha”. A nível articular, podem surgir fenómenos de osteólise, artrites e poliartrites, com tumefacção das articulações (Roze, 2005; Alexandre-Pires & Correia, 2008). A poliartrite foi descrita num cão jovem (Santos, Marcos, Assunção & Matos, 2006). Estes mesmo autores referem duas teorias para a patogenia da poliartrite em cães com *Leishmania*. A primeira consiste numa inflamação granulomatosa da sinovia devido à presença do parasita e, a segunda numa deposição de complexos imunes na sinovia, produzindo uma reacção de hipersensibilidade do tipo III, que atrai os neutrófilos e sugere a lesão da articulação por enzimas hidrolíticas. A nível ósseo, as lesões podem localizar-se no perióstio, lesões proliferativas e periosteíte (Souza et al., 2005; Baneth, 2006, Alexandre-Pires & Correia, 2008).

## **5.8. Lesões atípicas**

Estas lesões, apesar de serem menos frequentes, não deixam de ser importantes. A nível do sistema cardíaco, foram documentados os seguintes casos: um cão com pericardite fibrosa difusa, com parasitas nas células presentes no derrame pericárdico de coloração amarela, granulomas ventriculares e dois cães com vaculite necrosante sistémica e com hemorragias

em múltiplos órgãos (Blavier et al., 2001). A nível gastrointestinal, dois casos de enterite hemorrágica aguda, um caso de diarreia hemorrágica associada a uma pancreatite e alguns casos de colite crónica com melena (Adamama-Moraitou et al., 2007). Estes autores referem no seu trabalho que a prevalência de *Leishmania* na mucosa do cólon é bastante elevada, principalmente em cães sem sintomatologia aparente de colite, concluindo assim, que a LCan pode ser responsável por alguns casos de colite crónica, pelo menos em zonas endémicas.

A nível pulmonar, têm sido observados casos de pneumonia intersticial crónica em cães com *Leishmania*. O diagnóstico parasitológico é muito difícil nestes órgãos, daí que em muitos casos não são detectados os parasitas (Gonçalves, Tafuri, Melo, Raso & Tafuri, 2003). Outras formas atípicas em cães com leishmaniose, consistem em nódulos na mucosa lingual, gengival e peniana (Roze, 2005).

## **6. Diagnóstico**

O diagnóstico da LCan não difere muito do diagnóstico em humanos. Em ambos, deve-se ter em consideração os dados clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e bioquímicos, em conjunto (Moreno et al., 1999; Alvar et al., 2004; Corrales & Moreno, 2006). O facto de a LCan não apresentar uma manifestação patognomónica, faz com que muitos factores clínicos e patológicos sejam semelhantes a outras doenças dos canídeos, dificultando o seu diagnóstico (Reis et al., 2006; Campino & Maia, 2008). O diagnóstico de LCan pode ser complexo, porque nem todos os animais infectados com promastigotas metacíclicas, desenvolvem manifestações clínicas. Este facto não pode ser negligenciado, pois grande parte dos cães assintomáticos podem infectar os vectores, apesar de apresentarem um baixo risco em relação aos animais infectados (Campino & Maia, 2008). Tudo isto torna difícil o diagnóstico da LCan para os veterinários, patologistas clínicos e para os profissionais de saúde pública, em países endémicos como também, em regiões não endémicas (*Guest editorial*, 2008).

Apesar do investimento efectuado nos últimos anos não existe por enquanto, uma técnica 100% sensível e específica. Assim, o diagnóstico definitivo da LCan deve basear-se na história clínica do animal e nos resultados obtidos nos testes laboratoriais (Maia, 2005).

Os métodos de diagnósticos estão divididos em: Diagnóstico Laboratorial, Métodos de diagnóstico parasitológico (métodos directos e indirectos), Diagnóstico serológico e Diagnóstico Moléculas.

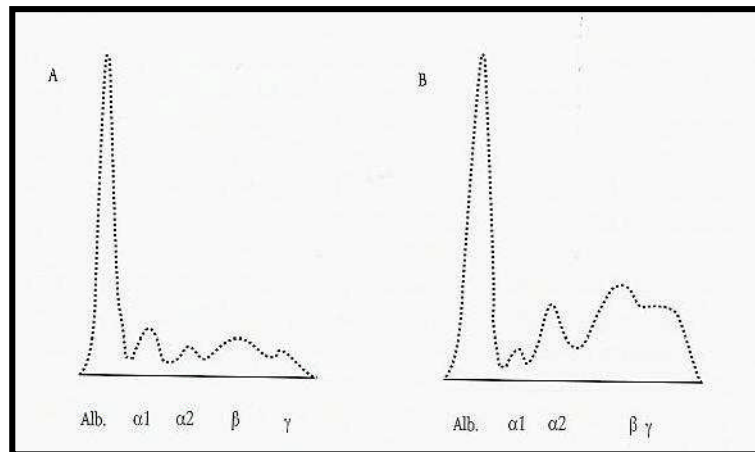
### **6.1. Diagnóstico Laboratorial**

Os sinais laboratoriais mais frequentes na LCan são alterações hematológicas, que se traduzem por uma anemia não regenerativa, normocítica e normocrómica (Reis et al., 2006; Dias et al., 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Ocasionalmente, podem

aparecer achados inconstantes, como leucopénia, com linfopénia moderada a grave e trombocitopénia (Baneth, 2006). A leucopénia é compreendida por diminuição das populações de monócitos, eosinófilos e linfócitos. Esta leucopénia deve-se a um mecanismo multifactorial, em que há diminuição da hematopoiese devido a uma disfunção medular afectada pelo intenso parasitismo da medula óssea, como também pelo recrutamento e enclausuramento de leucócitos em diferentes órgãos (Reis et al., 2006). Estes autores referem que também pode estar associado à secreção de citoquinas supressoras. Num estudo sobre hemostase realizado em cães da raça Beagle, Valladares et al. (1998), evidenciaram que os cães infectados com leishmaniose com uma ligeira trombocitopénia, também apresentavam uma diminuição na agregação paquetária, induzida pelo colagénio e um aumento do tempo de coagulação da trombina (TT) e, degradação dos produtos de fibrina (DPF). Indicando que a leishmania pode afectar primariamente a hemostase, coagulação e a fibrinólise, induzindo a uma CID compensada. A alteração do mecanismo de hemostase não é totalmente compreendido, mas múltiplos factores podem estar envolvidos. Uma CID pode ser desencadeada por uma lesão no endotélio pela presença de *Leishmania* ou por deposição de imunocomplexos (Valladares et al., 1998).

As alterações bioquímicas consistentes com um animal infectado por *L. infantum* são, hiperproteinémia com hiperglobulinémia (beta-globulinas e gama-globulinas) e hipoalbuminémia resultando num rácio de albumina/globulinas baixo (Figura 24) (Villiers & Blackwod, 2005; Baneth, 2006; Reis et al., 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

**Figura 24.** Proteinograma electroforético do soro de um cão saudável (A) e com leishmaniose canina (B) (Adaptado de Santos-Gomes et al., 2008)



**Legenda:** Alb, albumina;  $\alpha 1$ , globulina alfa ;  $\alpha 2$ , globulina alfa 2;  $\beta$ - fração betaglobulina; fração gamaglobulina.

Os factores que contribuem para o aumento das globulinas ainda não estão completamente compreendidos, porém, podem estar associados a uma estimulação policlonal dos linfócitos B mediada pelos antígenos de *Leishmania infantum*, assim como à síntese de anticorpos não específicos e à presença de CIC (Reis et al., 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A hiperproteinémia é um dado constante na LCan e, varia entre 8-12 g/dL. O rácio albumina/globulina geralmente é inferior a 0,5 (Moreno et al., 1999).

Com o evoluir da doença pode instaurar-se uma insuficiência renal devido à deposição de imunocomplexos (Baneth, 2006). Estes animais manifestam os parâmetros renais, ureia e creatinina aumentados (Moreno et al., 1999). O rácio proteína/creatinina urinária (UPC – *urine proteïne-creatinine*) permite fazer o diagnóstico de proteinúria e avaliar o grau da lesão renal (Baneth, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Um rácio de UPC inferior a 0,5 mg/dL é normal, enquanto que um rácio superior a 1 mg/dl é indicativo de uma doença glomerular primária (Ginel et al., 2008).

Caso desenvolva uma insuficiência hepática crónica, verifica-se um aumento das enzimas hepáticas, AST e ALT (Moreno et al., 1999; Baneth, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Contudo, são poucos os cães com leishmaniose, com um aumento das enzimas hepáticas e uma azotémia grave (Baneth, 2006).

## 6.2. Métodos de diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico parasitológico da leishmaniose, baseia-se na observação do parasita nas formas amastigota ou promastigota, consoante o método utilizado (Maia, 2005).

### 6.2.1. Métodos directos – Visualização do parasita

Um diagnóstico conclusivo pode ser obtido através da observação ao microscópio das formas amastigotas de *Leishmania*, a partir de citologias de material biológico obtido por punção aspirativa de medula óssea (costelas ou crista íliaca) e gânglios linfáticos (Maia, 2005; Campino & Maia, 2008). A maioria das amostras é obtida através de técnicas pouco invasivas (Alvar et al., 2004). As preparações podem ser coradas com Giemsa ou com outros derivados do Método de Romanovsky (e.g. *Leishman stain*), revelando os amastigotas livres ou intracelulares (em monócitos, macrófagos e neutrófilos) (Alvar et al., 2004; Campino & Maia, 2008; Gomes, Cacalcanti, Lira, Abath & Alves, 2008).

Esta técnica de exame directo é rápida e não onerosa, contudo, apresenta como desvantagem, uma baixa sensibilidade, permitindo a ocorrência de falsos negativos e exige técnicos experientes (Maia, 2005; Gomes et al., 2008). Segundo Alvar et al. (2004) e Roze (2005), uma citologia de medula óssea apresenta uma maior sensibilidade do que a dos gânglios linfáticos (60%-75% e 30%-50% respectivamente). A densidade parasitária é calculada e expressa em *Leishman Donovan Units* (LDU), que corresponde ao número de amastigotas por 1000 células nucleadas (Reis et al., 2006; Lage et al., 2007; Campino & Maia, 2008).

Liarte et al. (2001) descreveram um método directo e rápido, o *Quantitative Buffy Coat* (QBC<sup>®</sup>), que é altamente sensível (97%) na detecção de amastigotas no sangue periférico e da medula óssea em cães e em humanos com leishmaniose.

A análise histopatológica de órgãos infectados corados com hematoxilina e eosina (HE) também pode ser usada na detecção do parasita. Apesar da fraca sensibilidade desta técnica, foi demonstrado que em preparações de gânglios linfáticos, mais concretamente do linfonodo poplíteo, a detecção era mais eficiente (43,9% nos animais sintomáticos, 40% nos oligosintomáticos e 39,13% nos assintomáticos), seguido do baço e medula óssea (Campino & Maia, 2008). A biópsia do fígado e do baço, provavelmente os órgãos mais afectados, comporta muitos riscos, sendo evitados (Maia, 2005). Podem também realizar-se biópsias de pele, no entanto devido ao número elevado de células inflamatórias e de contaminantes, torna difícil a identificação do parasita (Alvar et al., 2004). A sensibilidade deste método é questionável, considerando que os parasitas não apresentam uma distribuição uniforme durante a infecção (Reis et al., 2006). Pereira da Fonseca e Villa de Brito (2008) mencionam que a pesquisa de amastigotas *in vivo*, a partir de esfregaços de matriz ungueal, de baço e de fígado, caíram em desuso por se utilizarem técnicas demasiado traumáticas ou por não serem insentas de risco de hemorragia interna.

### 6.2.2. Métodos indirectos

Os vários métodos indirectos desenvolvidos são: o isolamento em meio de cultura (NNN e outros), a inoculação em animais de experimentação, xenodiagnóstico e técnicas imunohistoquímicas.

A presença do parasita pode ser demonstrada após a inoculação em *hamsters* dourados (*Mesocricetus auratus*) ou em ratos (Alvar et al., 2004; Campino & Maia, 2008). Contudo, a inoculação de parasitas em animais não é implementado como um teste de diagnóstico, porque são necessários vários meses para obter resultados e, só pode ser aplicado em áreas de investigação (Alvar et al., 2004; Campino & Maia, 2008).

O xenodiagnóstico é uma técnica que permite a detecção e o isolamento do agente patogénico através do vector natural. Embora tenha sido utilizado para resolver algumas questões epidemiológicas, quanto à histórica clínica e ao tratamento da LCan, é raramente utilizado como método de diagnóstico, pois só é desenvolvido em laboratórios especializados e, na existência de uma colónia de insectos flébotomos (Campino & Maia, 2008).

O material de biópsia pode ser inoculado em meios de cultura monofásicos, como, o Meio *Schneider* para insectos, M199, RPMI, Meio de *Grace* ou em meios bifásicos, como, BHI (*Brain Heart Infusion*) e NNN (*Novy, McNeal e Nicolle*) (Campino & Maia, 2008). Os meios mais adequados para o crescimento de leishmanias são, os bifásicos (NNN), os semi-sólidos (e.g. agar-sangue, Locke) e os líquidos (RPMI 1640 e o meio de *Schneider* para *Drosophila*) (Moreno et al., 1999). A observação de formas promastigotas nas culturas apresenta como principais desvantagens a morosidade do resultado, (observação em uma semana e subculturas durante mais de três semanas), a contaminação microbiana e o facto de nem todos os isolados crescerem eficazmente em meio de cultura (Maia 2005; Campino & Maia, 2008). As culturas *in vitro* de diferentes tecidos apresentam uma especificidade de 100%, e uma sensibilidade entre 60% a 90%, todavia, devido às suas desvantagens, esta técnica está mais indicada para estudos epidemiológicos, em que é preciso isolar o parasita para a sua identificação bioquímica. As culturas são consideradas negativas, após quatro resultados negativos de subculturas sucessivas (Alvar et al., 2004).

Nas preparações imunohistoquímicas, em tecidos corados pela peroxidase ou por anticorpos marcados com fluoresceína, as formas amastigotas são realçadas por uma coloração específica (Alvar et al., 2004).

### 6.3. Diagnóstico Serológico

O diagnóstico imunológico é determinante quando os outros exames parasitológicos são negativos. É aplicado principalmente em estudos de seroprevalência e na determinação de focos de leishmaniose. Tem como objectivo detectar a existência de anticorpos específicos



anti-leishmania, geralmente do tipo IgG. São métodos de elevada sensibilidade e especificidade, mas limitados quando não há produção de anticorpos, durante o período de seroconversão, entre os 1,5 a 3 meses de infecção e, em animais que não desenvolvem uma resposta humoral (animais resistentes) (Moreno et al., 1999).

No ponto de vista clínico são muito úteis, mas devido à sua variabilidade sensitiva, subestimam o grau de infecção dos cães que vivem em zonas endémicas (Alvar et al., 2004; Barrouin-Melo et al., 2006). A existência de anticorpos anti-leishmania não implica doença (Maia, 2005; Baneth, 2006). Maia (2005) refere que, cerca de 10% dos cães infectados, com um título significativo de anticorpos anti-leishmania, nunca desenvolvem a doença. A autora refere que os cães sintomáticos podem ser seronegativos no início da infecção (período pré-patente) por ainda não ter havido produção de anticorpos específicos, assim como no final da doença, por falência do sistema imunitário. A quantidade de anticorpos produzida pode, ainda, não ser suficiente para ser detectada pelas técnicas aplicadas (Andrade et al., 2009). A existência de reacções cruzadas (com outros parasitas Babesia, Trypanossoma, Ehrlichia, Neospora), pode levar a uma interpretação errónea da serologia (falsos positivos) (Maia, 2005; Gomes et al., 2008). Em casos de serologia duvidosa, recomenda-se a utilização de outra técnica serológica ou de outro método de diagnóstico (Maia, 2005; Baneth, 2006).

### **6.3.1. Técnicas de diagnóstico serológico baseadas na imunidade humoral**

O diagnóstico serológico é frequentemente usado, devido à resposta humoral intensa desencadeada pelos cães com leishmaniose, com produção de anticorpos anti-leishmania (Alvar et al., 2004; Campino & Maia, 2008). São vários os métodos utilizados para pesquisar anticorpos anti-leishmania. Os métodos mais utilizados são: Imunofluorescência indirecta (IFI), ELISA, Contraimuno-electroforese (CIE) e Aglutinação directa (AD) (Maia, 2005). O *Western blotting* (WB), a imunodifusão (ID), a Imunocromatografia rápida (IR) e a citometria de fluxo (CF), são também métodos desenvolvidos para o diagnóstico de LCan, mas que são pouco utilizados (Campino & Maia, 2008).

A IFI é a técnica mais utilizada e de referência (*gold standard*) do diagnóstico seroimunológico, pela sua grande sensibilidade e especificidade (Carvalho & Santos, 2006; Lage et al., 2007; Campino & Maia, 2008). Campino e Maia (2008) referem que a IFI apresenta uma sensibilidade entre 21,6% a 100%. Num estudo realizado por estes mesmos autores, com base na técnica de imunofluorescência, evidenciou-se uma especificidade de 100% e sensibilidade de 92,68%, 60% e 73,91% em animais sintomáticos, oligosintomáticos e assintomáticos respectivamente. No entanto, podem ocorrer falsos negativos, devido à sensibilidade à carga parasitária ou falsos positivos, por identificação errónea de artefactos por amastigotas (Campino & Maia, 2008). Os antigénios utilizados nesta técnica são,

promastigotas inteiros provenientes de culturas *in vitro* (Moreno et al., 1999; Carvalho & Santos, 2006). A positividade é indicada pela presença de uma imunofluorescência verde maçã sobre o corpo do parasita e negatividade pela coloração avermelhada (Maia, 2005; Campino & Maia, 2008). A sua aplicação requer pessoas experientes e equipamento especializados e dispendioso (Campino & Maia, 2008).

Ao longo dos anos foram desenvolvidos *kits* rápidos comerciais de ELISA (Moreno et al., 1999; Campino & Maia, 2008). A técnica de ELISA consiste numa reacção imunoenzimática para a detecção de imunoglobulinas específicas nos soros. É útil em análises laboratoriais ou mesmo no campo e, permite analisar grande número de amostras em pouco tempo. É simples e está adaptado aos vários tipos de antigénios (citoplasma, antigénios purificados, peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes). Muitos dos *kits* comerciais de detecção rápida de anticorpos anti-*Leishmania*, apresentam uma sensibilidade e especificidade baixa (Ferroglia et al., 2007). Este problema pode ser ultrapassado através do uso de ELISA associada a proteínas recombinantes específicos de *L. infantum*. Estudos recentes comprovaram a existência de uma reacção entre os anticorpos e a proteínas recombinantes rK39 em cães com leishmaniose (Gomes et al., 2008). Estes autores mencionam que uma reacção à rK39 é um indicativo serológico da doença causada por *L. infantum*. Adicionalmente à rK39, outros três antigénios recombinantes (K9, K26 e K29 sub) foram expressos num sistema procariótico e avaliados como marcadores de diagnóstico para LCan através de ELISA. A sensibilidade e especificidade de ELISA K26 é de 100%, enquanto que o K9 e K29sub, apresentam uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 100% (Gomes et al., 2008). De acordo com estes autores, estes resultados indicam que cada antigénio possui um epitopo imunodominante e, que a sua combinação aumentará a sensibilidade dos métodos serológicos actualmente disponíveis.

A CIE é uma técnica qualitativa que permite detectar anticorpos anti-leishmania (Campino & Maia, 2008). Consiste na migração electroforética em suporte de acetato gelificado (*e.g.* Cellologel<sup>®</sup>) do antigénio e dos soros a testar (Maia, 2005). A visualização de uma coloração azul devido ao corante Azul de *Coomassie* é indicativa de uma precipitação do antigénio-anticorpo (Ag-Ac) no acetato gelificado (Campino & Maia, 2008).

A AD consiste na incubação à temperatura ambiente de diluições seriadas da amostra de soro. O antigénio pode apresentar-se em duas formas, em suspensão ou numa forma sólida seca. Esta última mantém-se constante a temperaturas elevadas. É um método simples e barato, ideal para o campo e laboratório. Uma das suas desvantagens é o tempo de incubação (18 horas) e, o número de diluições necessária, não permitindo analisar grandes quantidades de amostras. Outro método, o FAST (*fast agglutination screening test*), combina a concentração

do parasita a um volume mínimo de amostra. Nesta técnica apenas há uma diluição e os resultados são obtidos após três horas. Foi também desenvolvido uma técnica *AD-easy*, que é menos dispendiosa e morosa em relação à técnica AD clássica (Campino & Maia, 2008).

O WB é uma técnica que não é utilizada como método de rotina no diagnóstico de LCan, porque requer muita experiência, tempo, é difícil de manusear e dispendioso (Campino & Maia, 2008). Apesar de tudo, é mais sensível que as técnicas de IFI e de ELISA e altamente específico (Alvar et al., 2004; Gomes et al., 2008)

A ID consiste numa dupla imunodifusão em gel de agarose a 1%, com 3% de polietilenoglicol (PEG) de amostras de soro e antígenos solúveis de *Leishmania* (Campino & Maia, 2008). O resultado positivo traduz-se por bandas coradas pelo Azul de *Coomassie*. Esta técnica é simples de efectuar, não necessita de equipamentos sofisticados e permite analisar várias amostras ao mesmo tempo. Campino e Maia (2008) relatam estudos em que cães de zonas endémicas e não endémicas apresentavam uma especificidade de 98% e 100% respectivamente e, uma sensibilidade de 69% em cães sintomáticos com culturas negativas e de 100% em cães sintomáticos.

A técnica de IR é baseada em tiras de papel de nitrocelulose (*dipstick*) impregnadas com uma proteína recombinante rK39. A positividade traduz-se quando ocorrem duas linhas (controlo e amostra), não sendo considerado válido quando o controlo não é visualizado (Campino & Maia, 2008). Este método apresenta uma sensibilidade de 70,9% e uma especificidade de 84,9% (Gomes et al., 2008). É um método fácil de executar, pouco invasivo e, permite uma intervenção rápida do veterinário (Alvar et al., 2004).

O CF é uma técnica que permite quantificar e examinar partículas microscópicas suspensas num fluido. Possibilita uma análise física e química simultânea de uma única célula através de aparelhos de detecção electrónicos ou ópticos. É um método rápido, preciso e reprodutível, que permite analisar várias partículas em segundos, separando-as e isolando-as consoante as suas propriedades (Campino & Maia, 2008). Apesar das grandes vantagens que este método apresenta, ainda não é usado no diagnóstico da LCan. A sua aplicação permitiu melhorar o conhecimento da resposta imunitária estabelecida pela *L. infantum* (Campino & Maia, 2008).

### **6.3.2. Técnicas de diagnóstico serológico baseadas na imunidade celular**

Os métodos utilizados para avaliar a resposta imunitária mediada por células são: Teste de Montenegro, o método de proliferação linfocitária (*Lymphocyte proliferation assay* (LPA)) e o *Interferon- $\gamma$  cytophatic effect inhibition bioassay* (IFNB). Estes testes são raramente usados como diagnóstico *standard* na LCan (Campino & Maia, 2008).

O teste de Montenegro ou teste dérmico (LST), consiste numa inoculação intradérmica de uma suspensão de promastigotas inactivados ( $3 \times 10^{6-8}$ /ml) diluída em fenol e numa solução

salina de metiolato. A positividade traduz-se por uma reacção de hipersensibilidade retardada ao antigénio de *Leishmania*, com um diâmetro mais de 5 mm, após 48 a 72h da inoculação (Alvar et al., 2004; Campino & Maia, 2008). No geral, durante a doença activa o LST é negativo, enquanto que em infecções subclínicas ou após o tratamento é positivo, devido à reacção imunológica formada em casa situação (Campino & Maia, 2008).

O método de LPA consiste na separação das células do sistema mononuclear, através da estimulação com LSA (*Leishmania infantum soluble antigen*). A proliferação é expressa através do índice de células estimuladas/células não estimuladas. Animais resistentes e assintomáticos, apresentam uma forte proliferação ao antigénio *Leishmania*, enquanto que os animais susceptíveis respondem à estimulação *in vitro* de LSA (Campino & Maia, 2008).

O IFNB consiste na detecção da produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos no sobrenadante de culturas. A produção de IFN- $\gamma$  é expressa pela diluição máxima, que protege 50% das células mononucleares estimuladas *versus* as não estimuladas. Quando o rácio é superior ou igual a 2 é considerado positivo. Este método quantifica as citocinas que contribuem para a formação de uma resposta imunitária celular e, pode ser o método de escolha, para avaliar o tipo de resposta imunitária desenvolvida nos cães (Campino & Maia, 2008).

#### 6.4. Diagnóstico Molecular

Actualmente a técnica de PCR é o método mais sensível e com maior sucesso no diagnóstico de LCan. Existem vários protocolos do PCR utilizados por diferentes laboratórios, com objectivo em determinar certas sequências de genes (*Guest editorial*, 2008). O PCR é um método que permite a detecção do ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Leishmania* nos órgãos infectados, independentemente de se tratar de parasitas viáveis ou não (Maia, 2005). O ADN do parasita pode ser detectado numa grande variedade de amostras, tais como, sangue, soro, *buffy coat*, medula óssea, gânglios linfáticos, pele ou em esfregaços de conjuntiva (Campino & Maia, 2008). O PCR conjuntival foi recentemente demonstrado como um método não invasivo e preciso no diagnóstico da LCan (Baneth, 2006). O ADN de *Leishmania* também pode ser encontrado em amostras biológicas que não são testadas regularmente, como, baço, fígado, coração, vagina, *rede testis*, sémen, útero, placenta, rins, intestino, leite e na urina (Campino & Maia, 2008).

A sensibilidade e especificidade do PCR dependem de inúmeros factores, dos *primers*, do número de cópias, do método de extracção do ADN, da amostra e do protocolo do PCR (Alvar et al., 2004; Campino & Maia, 2008). Maia (2005) menciona apresentar uma sensibilidade e especificidade elevadas, permitindo a detecção de um único parasita

O uso do PCR em amostras biológicas periféricas (*e.g.* sangue) é simples e mais aceitável pelos donos, não sendo assim necessário submeter o animal a métodos muito invasivos mas,

não é a melhor amostra para detectar o ADN de *Leishmania*, por não ser tão abundante como na pele e nos gânglios linfáticos (Alvar et al., 2004; Campino & Maia, 2008; *Guest editorial*, 2008).

Estudos em diferentes tecidos de cães infectados, por vezes apresentam resultados variáveis e conflituosos. Estes resultados dependem da técnica aplicada, do método de armazenagem, e do protocolo de PCR implementado (*Guest editorial*, 2008).

O desconhecimento da duração, da variabilidade e intensidade da parasitémia nos hospedeiros, pode levar a falsos negativos, especialmente em animais assintomáticos. Por outro lado, falsos positivos, devido à presença de restos de *Leishmania* após o tratamento e não do parasita vivo (Campino & Maia, 2008).

O PCR em tempo real (TR-PCR) é um método de diagnóstico adicional, que permite quantificar o número de ADN nos tecidos, através de uma monitorização contínua das sequências de ADN amplificadas (Roze, 2005; Campino & Maia, 2008; Gomes et al., 2008; *Guest editorial*, 2008). Apresenta como vantagens, uma maior sensibilidade que o PCR *standard*, um reduzido risco de contaminação, um reduzido tempo de prova e, mede a cinética da reacção nas fases iniciais. O PCR quantitativo é muito útil no diagnóstico da LCan e, facilita a monitorização da carga parasitária antes e depois do tratamento (Campino & Maia, 2008; Gomes et al., 2008). O PCR quantitativo é muito útil quando é necessário um diagnóstico sensitivo e imediato, especialmente quando os animais são serologicamente duvidosos (Gomes et al., 2008).

No Hospital Clínic Veterinari de Barcelona, Espanha, o diagnóstico da LCan é essencialmente clínico. É realizado com base na história clínica do paciente, análises hematológicas e bioquímicas, proteinograma e na combinação de dois métodos laboratoriais, um método serológico (ELISA de competição) e um método molecular (RT-PCR).

## **7. Terapêutica**

O tratamento da leishmaniose canina é um tema de grande conflito (Moreno et al., 1999; Meireles, 2008). Na maioria dos casos, cães sujeitos ao tratamento não conseguem eliminar os parasitas na totalidade, e apenas há uma remissão dos sintomas, ficando, por vezes curados clinicamente durante 6 meses a um ano, mas portadores da doença, mas com uma reduzida capacidade infectante para os flebotomos (Moreno et al., 1999; Meireles, 2008). Regra geral, podem ocorrer recidivas em seis meses a dois anos. A localização intracelular do parasita e o seu acantonamento em certos órgãos, o desenvolvimento de uma resistência aos fármacos e, uma ausência de uma resposta imunitária celular que acompanha a acção dos fármacos, são alguns dos factores responsáveis pela origem de recidivas. Outra razão deve-se à criação de

uma resistência por *Leishmania* devido à aplicação inadequada dos fármacos, doses e duração do tratamento (Moreno et al., 1999; Meireles, 2008).

Do ponto de vista ético, a aplicação de uma terapêutica requer um diagnóstico precoce da doença através de um exame clínico e exames complementares, da avaliação do estado sanitário e imunitário do animal, e de uma selecção correcta do fármaco e sua aplicação, consoante o estado clínico do animal (Moreno et al., 1999; Alvar et al., 2004; Meireles, 2008). Os proprietários deverão ser responsabilizados nas várias decisões, sempre devidamente informados acerca do prognóstico da doença, custos prováveis do tratamento e assistência veterinária, e implicações da doença em termos de saúde pública. Actualmente, existem várias drogas utilizadas na terapêutica da Leishmaniose canina, não só como tratamento etiológico, mas também sintomático (Meireles, 2008).

### **7.1. Compostos antimoniais pentavalentes**

Antimoniais pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ) têm sido os fármacos de eleição desde há muito tempo, para o tratamento da leishmaniose canina e humana. Existem dois compostos antimoniais pentavalentes utilizados em cães, o Antimoniato N.metil glucamina ou Antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) e o Estibogluconato de sódio (Pentostan<sup>®</sup>) (Baneth & Shaw, 2002; Baneth, 2006). Sendo o Glucantime<sup>®</sup> o mais utilizado nas zonas latinas, e o Pentostan<sup>®</sup> em países anglosaxónicos (Meireles, 2008).

Estes compostos destroem as formas amastigotas de *Leishmania*, por inibição da enzima fosfofructoquinase, responsável pela glicólise e oxidação dos ácidos gordos (Corrales & Moreno, 2006; Baneth, 2006; Ikeda-Garcia et al., 2007) e da enzima piruvatodesidrogenase (Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008). Também impedem a replicação do ADN devido à inibição da enzima topoisomerase (Corrales & Moreno, 2006).

Num consenso geral de vários autores, a dose recomendada de Glucantime<sup>®</sup> é de 100 mg/kg em injeção diária (Corrales & Moreno, 2006; Baneth, 2006; Meireles, 2008). Todavia, neste protocolo, os níveis de antimoniais no plasma são inferiores à dose média efectiva ( $ED_{50}$ ), devido à sua rápida metabolização (Alvar et al., 2004). Por estas razões, Alvar et al. (2004) e Baneth e Shaw (2002) concluíram que a dose recomenda deve ser de 75 mg/kg, BID, apesar de outros autores recomendarem 100 mg/kg em duas injeções por dia.

A maioria dos autores recomendam 2 a 3 séries de administrações diária, durante 20 a 30 dias consecutivos ou em dias alternados, com intervalo em cada série de 15 dias a um mês (Baneth & Shaw, 2002; Baneth et al., 2005; Meireles, 2008).

A via de administração pode ser intravenosa (IV) lenta, intramuscular (IM) e subcutânea (SC) (Baneth, 2006; Meireles, 2008). Com base em estudos farmacocinéticos, foi comprovado que a administração deste composto, por via intravenosa permite alcançar grandes concentrações,

porém, as vias intramuscular e subcutânea são mais adequadas, porque mantêm os níveis plasmáticos durante mais tempo (Corrales & Moreno, 2006). Por vezes, quando administrado por via IM, o fármaco poderá originar abscessos, fibrose muscular, dor, hemorragia ou claudicação devido ao volume inoculado e à frequência de administração (Baneth & Shaw, 2002; Alvar et al., 2004; Roze, 2005; Meireles, 2008). Quando é administrado pela via IV as complicações são mais graves, podendo causar tromboflebitis (Alvar et al., 2004; Baneth, 2006).

Relativamente ao Pentostan<sup>®</sup>, a dose recomendada é de 10-20mg/kg, via intramuscular, com protocolos idênticos ao do Glucantime<sup>®</sup> (Meireles, 2008).

Apesar da sua baixa nefrotoxicidade, alguns cães apresentam alguma intolerância a esta droga, manifestando febre, problemas músculo-esqueléticos (*e.g.* mialgias e artralgias), alterações gastrointestinais (*e.g.* vômito, diarreia), apatia e alterações hepáticas, renais e pancreáticas (Aste et al., 2005; Corrales & Moreno, 2006; Meireles, 2008). Outros efeitos secundários que se podem manifestar, mas com menos frequência são, lesões oculares e cardiotoxicidade (Corrales & Moreno, 2006).

Grande parte destes compostos são excretados pela urina e apenas uma parte é reduzida à forma tóxica  $Sb^{3+}$ , que pode acumular-se no organismo. Isto ocorre, quando a terapêutica é prolongada por muito tempo (mais de 2 meses) ou em cães com insuficiência renal, hepática ou cardíaca (Baneth, 2006).

O uso dos compostos antimoniais pentavalentes tem sido limitado ao longo dos anos, devido à formação de resistências (Baneth & Shaw, 2002).

## **7.2. Análogos de Purinas (pirazolopiridinas)**

O Alopurinol (Zyloric<sup>®</sup> ou Alopurinol<sup>®</sup>) é um análogo das purinas com propriedades leishmanioestáticas (Moreno et al., 1999; Alvar et al., 2004; Meireles, 2008).

É composto por uma estrutura de hipoxantina, que quando é metabolizada pelas leishmanias produz um análogo inactivado, a inosina (Baneth & Shaw, 2002; Baneth, 2006; Manna et al., 2008). O seu mecanismo de acção consiste na incorporação deste análogo no ARN do parasita, inibindo a síntese proteica e impedindo a replicação do parasita (Baneth et al., 2005; Roze, 2005; Baneth, 2006; Meireles, 2008).

A sua baixa toxicidade, a forma de administração e o seu baixo custo, tornam este fármaco uma mais-valia perante os antimoniais (Moreno et al., 1999; Ferasin & Knight, 2005; Meireles, 2008). Apesar da sua baixa toxicidade, pode causar algumas reacções adversas, tais como, alterações gastrointestinais (*e.g.* vômito) e hiperxantúria que pode causar urolíase (Baneth & Shaw 2002; Corrales & Moreno, 2006; Baneth, 2006).

A dose varia entre 4 mg a 40 mg/kg por dia, via oral (PO) e embora, a dose mais utilizada seja de 20 mg/kg, cada 24 horas, via oral por tempo indefinido (Baneth et al., 2005; Roze, 2005; Baneth, 2006; Meireles, 2008). A maioria dos veterinários recomenda a associação do Zyloric<sup>®</sup> (20 mg/kg BID) com o Glucantime<sup>®</sup> (100 mg/kg SID), durante 20 dias, continuando depois com o Zyloric<sup>®</sup> por tempo indefinido (Baneth & Shaw, 2002; Baneth et al., 2005; Roze, 2005). Esta combinação tem como vantagens, a redução do tempo de tratamento com Glucantime<sup>®</sup>, tornando a terapêutica mais tolerável e menos onerosa e reduz a probabilidade de uma recidiva (Baneth & Shaw, 2002; Baneth et al., 2005).

### **7.3. Antibióticos**

A anfotericina B é um composto macrólido poliénico, que é comumente usado como anti-fúngico, mas que também apresenta actividade contra protozoários (Baneth & Shaw, 2002; Baneth et al., 2005; Baneth, 2006). Actua, unindo-se ao ergosterol da membrana da leishmania, alterando a sua conformação e permeabilidade e, causando a morte do parasita por lise osmótica (Alvar et al., 2004).

O protocolo terapêutico varia consoante os autores, variando em 0,1 mg a 1 mg/kg diluído em 10-20 ml de dextrose a 5% e, administrado em grandes volumes por via IV lenta, durante dois meses (Alvar et al., 2004; Corrales & Moreno, 2006; Meireles, 2008). Pode ser administrado em doses reduzidas diariamente ou doses elevadas cada dois dias (Alvar et al., 2004). Baneth e Shaw (2002), Baneth et al. (2005), Roze (2005) e Corrales e Moreno (2006), recomendam uma dose entre 0,5-0,8 mg/kg, IV, duas vezes por semana de modo a alcançar uma dose acumulativa de 10 mg/kg.

Este antibiótico, é muitas vezes, a escolha em caso de insucesso por parte dos antimoniais (Meireles, 2008). Conquanto, tem acção nefrotóxica, causando uma vasoconstrição das arteriolas aferentes e eferentes e conseqüentemente uma diminuição do filtrado glomerular (Alvar et al., 2004; Baneth et al., 2005; Baneth, 2006). De modo a reduzir o seu efeito tóxico, pode ser administrado associado a emulsões lipídicas, como o Intralipid<sup>®</sup> ou em fórmulas lipossomais, como o AmBisome<sup>®</sup>, facilitando a sua captura pelos macrófagos e acumulação nos órgãos viscerais (Baneth et al., 2005; Baneth, 2006). As emulsões lipídicas apresentam uma elevada taxa de sucesso em relação às formulações lipossomais (Baneth, 2006). Para além de o efeito secundário referido, também podem causar flebites, anorexia, vómitos, hipocalcémia, anemia, aumento da ureia e creatinina, icterícia, febre e, em casos graves, paragem cardíaca (Meireles, 2008).

A Aminosidina ou Paromomicina, é um aminoglicosídeo, que actua nos ribossomas, inibindo a síntese proteica, e é muitas vezes associado aos antimoniais, potenciando a sua acção (Alvar



et al., 2004; Meireles, 2008). A dose recomendada é de 5-10 mg/kg, cada 12 hora, SC ou IM, com precaução devido à sua nefrotoxicidade e ototoxicidade (Roze, 2005; Meireles, 2008).

#### **7.4. Diamidinas**

A Pentamidina é uma diamidina aromática frequentemente utilizada nas tripanosomoses, babesiose e pneumocistose (Baneth & Shaw, 2002; Baneth et al., 2005). Actualmente é usada no combate à leishmaniose, em casos de resistência dos antimoniais (Moreno et al., 1999; Meireles, 2008; Ramsey, 2008).

A sua actividade está relacionada com uma desorganização no metabolismo das proteínas e ácidos nucleicos, alterações das mitocôndrias, ribossoma, cinetoplasto e bolsa flagelar (Meireles, 2008). A dose usada é de 4 mg/kg, IM, em dias alternados, durante 20 dias (Roze, 2005; Meireles, 2008; Ramsey 2008).

Em sua desvantagem, as pentamidinas além de não serem tão eficientes como os antimoniais, exibem efeitos tóxicos, que se manifestam por dor e necrose no local de injeção, nefrite, hepatite, dor abdominal, vômitos, hipotensão e síncope (Baneth & Shaw, 2002; Roze, 2005; Meireles, 2008).

#### **7.5. Miltefosina**

A miltefosina é um acilfosfolípido sintético, que actua inibindo a síntese de glucolípidos e glucoproteínas da membrana do parasita, com actividade contra as formas promastigotas extracelulares e destruição das amastigotas (Corrales & Moreno, 2006; Meireles, 2008). Também estimula a produção de linfócitos T, macrófagos e, de compostos reactivos intermédios de nitrogénio e oxigénio (Baneth & Shaw, 2002; Manna et al., 2008). Recentemente comercializado em Portugal, o Milteforan<sup>®</sup>, solução oral com 20 mg/ml de Miltefosina e é recomendado na dose de 2-3 mg/kg diariamente durante 28 dias. Apresenta a vantagem de não ser eliminada pelas vias renais, podendo ser assim administrado a cães com insuficiência renal (Corrales & Moreno, 2006; Meireles, 2008).

#### **7.6. Outros fármacos**

Os derivados de Imidazol (Metronidazol, Ketoconazol, Itraconazol e Secnidazol). Apresentam afinidade pelos esteróis das membranas celulares das leishmanias, inibindo a sua síntese. Alteram também a gluconeogénese, intensificando-a, provocando a depleção das reservas glucogénicas e morte das leishmanias, assim como inibem a síntese dos ácidos nucleicos, devido à formação dos complexos com o ADN (Meireles, 2008).

Vários são os compostos em estudo e experimentação com interesse na leishmaniose. As Lepidinas (8-aminoquinolona), Alalinamidas, Clorpromazina, Clomipramina, Hexadecilfosfocolina, Domperidona, Marbofloxacina são alguns dos fármacos em estudo

(Meireles, 2008; Rougier, Vouldoukis, Fournel, Pèrés & Woehrlé, 2008; Gómez-Ochoa et al., 2009).

Perante as alterações imunológicas que surgem no decorrer na infecção, podem ser usados imunomoduladores inespecíficos (Prednisona, Prednisolona, Levamizol) ou específicos (citoquinas) (Moreno et al., 1999). O uso de corticosteróides numa doença parasitária é controverso e, só devem ser utilizados em casos de produção de imunocomplexos, como nas situações de insuficiência renal e uveíte (Roze, 2005). O uso de citoquinas para modelar a resposta imunitária ainda é limitado e requer estudos mais aprofundados. Uma vez estabelecida que terapêutica etiológica deve ser aplicada, em simultâneo, uma terapêutica sintomatológica. Logo, todos os cães em tratamento, consoante o caso clínico, devem ser submetidos a uma antibioterapia de amplo espectro, fluidoterapia, anti-inflamatórios, dietas hipoproteicas, transfusões sanguíneas e uma terapêutica efectiva para a insuficiência renal (Meireles, 2008).

No Hospital Clínic Veterinari de Barcelona, o protocolo de tratamento consiste numa associação Glucantime<sup>®</sup> (50 mg/kg cada 12 horas ou 75-80 mg/kg cada 24 horas) e Zyloric<sup>®</sup> (10 mg/kg cada 12 horas) durante 30 dias, continuando depois com o Zyloric<sup>®</sup> na dose já referida. Consoante a evolução clínica do paciente, pode ser necessário alterar a dose medicamentosa, mudar de fármacos ou, até mesmo interromper a terapêutica. Assim, de modo a controlar esta evolução, é requerida uma avaliação constante dos seguintes parâmetros: hemograma, bioquímicas, proteinograma, urinálise e um teste serológico para detecção de Ac anti-leishmania. Esta re-avaliação pode ser realizada após dias, semanas e até mesmo meses, consoante o caso clínico.

## **8. Prognóstico**

O prognóstico da LCan é reservado e dependendo principalmente da gravidade das lesões que o animal apresenta, do tempo decorrido até o diagnóstico, da resposta imunitária individual e da progressão da doença. Na ausência de insuficiência renal e, através da aplicação de uma terapêutica eficaz, verifica-se uma melhoria da sintomatologia dérmica e sistémica da doença (Baneth, 2006).

## **9. Profilaxia**

O controlo da leishmaniose canina implica levar a cabo diferentes estratégias, todas elas importantes. Podemos actuar directamente no cão doente, mediante a aplicação de uma terapêutica ou através da imunoprofilaxia. Por outro lado, podemos actuar sobre o vector, mediante o uso de insecticidas no hospedeiro vertebrado ou no meio ambiente, evitando a picada dos flébotomos (Miró, 2008).

A inexistência de uma terapêutica 100% eficaz, a impossibilidade de testar todos os cães, devido ao custo que comportam, a existência de cães assintomáticos, e o facto de a LCan apresentar um longo período de incubação, são alguns dos factores, que levam à impossibilidade da erradicação da doença (Meireles, 2008).

Quanto à imunoprofilaxia, apenas no Brasil se encontra licenciada uma vacina contra a leishmaniose canina (Leishmune<sup>®</sup>). Apesar dos avanços recentes nas tecnologias e no conhecimento desta doença, a preparação de uma vacina contra a leishmaniose, não se tem mostrado fácil. Contudo, a presença de casos assintomáticos ou subclínicos de leishmaniose canina, que se resolvem por si, indicam que a vacinação é possível (Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008)

O facto dos animais infectados serem o reservatório principal na transmissão da leishmaniose aos humanos, implica que haja um controlo sanitário e uma vigilância por parte dos Médicos Veterinários (Moreno et al., 1999; Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008). Um dos critérios sugeridos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é a eutanásia dos animais infectados, porém, o plano sanitário da zona do Mediterrâneo não contempla esta opção e, eventualmente rejeitada por muitos donos, devido ao grande afecto pelos animais (Baneth et al., 2005; Corrales & Moreno, 2006).

As medidas preventivas com o objectivo de interromper a transmissão do parasita ao vertebrado e controlar deste modo a doença, têm sido levadas a cabo através da utilização de insecticidas. Os piretróides sintéticos (*e.g.* permetrina e deltametrina), são os insecticidas eleitos para serem utilizados na prevenção da picada dos flébotomos (Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008). Miró (2008) comenta no seu estudo, que a combinação dos insecticidas piretróides com outros insecticidas nicotínicos (*e.g.* imidaclopride), produz-se um efeito sinérgico muito benéfico, que aumenta consideravelmente a sua eficácia.

Alvar et al. (2004), Baneth (2006), Miró (2008) e Pereira da Fonseca e Santos-Gomes (2008), recomendam o uso de insecticidas em aplicações *spot on*, coleiras ou *sprays*. Num estudo recente, Mazillo et al. (2006) concluíram que as coleiras impregnadas com deltametrina (Scalibor<sup>®</sup>), podem influenciar o curso da infecção da doença. Apesar de conferirem uma protecção durante 34 semanas, a sua eficiência é limitada, por serem fáceis de perder ou de se partirem durante a rotina diária do animal (Mazillo et al., 2006).

Otranto et al. (2007) demonstraram a eficiência da associação de 10% de Imidacloprid e 50% de Permetrina (Advantix<sup>®</sup>), numa formulação em aplicação *spot on* tópica, na protecção de cães que vivem em zonas endémicas. Num estudo realizado por Ferroglio, Poggi & Triscioglio (2006), usando uma aplicação *spot on* composta por 65% de permetrina (Exspot<sup>®</sup>), comprovou-se uma redução no risco de infecção.

As pulverizações insecticidas são um meio de controlo eficaz, embora não sejam viáveis em zonas urbanas e suburbanas (Roze, 2005).

Além do uso de insecticidas, também podemos aconselhar aos donos a manterem os animais no interior das habitações, do anoitecer até ao amanhecer, nas épocas de maior actividade do vector (Roze, 2005; Baneth, 2006; Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008).

Num estudo recente, Saridomichelakis et al., (2005) concluíram que a administração periódica de Zyloric<sup>®</sup>, numa dose diária de 20 mg/kg, durante uma semana em cada mês, não previne os cães saudáveis de serem infectados por *L. infantum*, como também não eliminava o parasita presente em cães assintomáticos.

## **10. Importância em Saúde Pública**

Os cães infectados com *Leishmania* são potenciais reservatórios do parasita para o Homem, pelo que deverão ser controlados através do diagnóstico precoce da doença, do tratamento e profilaxia e, em certos casos, eutanasiados (Baneth et al., 2005).

No entanto, e de acordo com Catorze (2005), até à actualidade, a leishmaniose humana era considerada na Bacia do Mediterrâneo apenas como uma zoonose, isto é, uma doença transmitida ao homem a partir de um reservatório animal

As formas clínicas clássicas de leishmaniose humana são a leishmaniose visceral (LV) ou kala-azar, cutânea (localizada, recidivante, generalizada e dérmica pós-Kala-azar) e mucocutânea (LMC) (Catorze, 2005).

A Leishmaniose visceral (LV) ou “Kala-azar”, atinge habitualmente hospedeiros imunocompetentes nas áreas endémicas. Contudo, desde a década de 1980, tem vindo a ser reconhecida como uma infecção oportunista associada a estados de imunossupressão, particularmente à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (Marques et al., 2007).

Segundo a OMS, os primeiros 1700 casos reportados de co-infecção VL/VIH até 1998, em 33 países, 85% foram observados em Espanha, Itália, França e Portugal. Apesar da distribuição geográfica da leishmaniose estar restrita às áreas de distribuição dos vectores, a infecção VIH modifica o tradicional padrão de transmissão zoonótico/antroponótico (Marques et al., 2007).

Nos últimos anos foi proposto, especialmente nos países do Sul da Europa, um ciclo de transmissão alternativo que inclui a partilha de seringas pelos utilizadores de drogas endovenosas. Existem ainda outras vias de transmissão que ocorrem mais raramente, nomeadamente através de transfusão sanguínea, prática de sexo anal, transmissão congénita e exposição ocupacional adquirida em laboratórios (Marques et al., 2007). As alterações ambientais, o movimento populacional, podem levar à alteração da área e densidade dos vectores e reservatórios, aumentando a exposição do homem aos flébotomos (Dujardin et al.,

2008). A idade (crianças com menos de 2 anos) e a má nutrição, são outros factores que predisõem a infecção (Baneth et al., 2005; Gramiccia & Gradoni, 2005).

O número de casos no Brasil têm vindo a aumentar ao longo dos anos, especialmente em zonas urbanas e em pessoas com SIDA. A falta de êxito no controlo da leishmaniose, levou a que fosse realizado um plano de controlo. Assim, foi desenvolvido um plano de controlo que é usado há 40 anos, composto por três medidas: na distribuição gratuita dos medicamentos; no controlo de reservatórios domésticos e no controlo de vectores (Costa & Vieira, 2001).

Segundo a OMS, o controlo leishmaniose tem vindo a ser efectuado por várias entidades públicas e privadas. Um das iniciativas foi do governo espanhol com OMS, para controlar a leishmaniose visceral na Etiópia e no Sudão. Algumas companhias farmacêuticas acordaram em reduzir o preço dos medicamentos. A OMS propôs à maioria dos países endémicos, a realização de um treino especializado com objectivo de ajudar realizar programas de controlo a nível nacional (OMS, 2006).

### **III. Estudo de doenças parasitárias do cão transmitidas por insectos culicídeos e psicodídeos, observadas na Clínica SPAD – Sociedade Protectora dos Animais Domésticos do Funchal, Ilha da Madeira e, no Hospital Escolar da Universidade Autónoma de Barcelona, Espanha**

A escolha deste tema, baseou-se principalmente na diferente casuística encontrada nos locais onde a autora realizou o estágio curricular, na Ilha da Madeira e em Barcelona. Este estudo englobou duas doenças, uma causada pelo nemátode *Dirofilaria immitis* e outra pelo protozoário *Leishmania infantum*. A dirofilariose foi sobretudo encontrada na Ilha da Madeira, enquanto que em Barcelona, foram especialmente observados casos de leishmaniose.

#### **1. Materiais e métodos**

##### **1.1. Dirofilariose**

O estágio curricular efectuado na clínica SPAD do Funchal, Ilha da Madeira, que decorreu entre 28 de Setembro a 28 de Novembro de 2008, foi essencial para a detecção de possíveis de infecções por *D. immitis* e até mesmo casos de dirofilariose. Durante este período foram testados 29 animais, em que 14 eram do sexo feminino e 15 do sexo masculino. O diagnóstico foi obtido a partir de várias técnicas, nomeadamente pela técnica de Knott modificada (n=25) com diferenciação pela fosfatase ácida (n=1), métodos serológicos (n=4) e pela observação ao microscópico em “gota a fresco” (n=1). Concomitantemente, foram realizados exames complementares, como hemograma, bioquímicas sanguíneas, radiografias e electrocardiografias.

A informação inerente a este estudo, foi obtida durante o estágio curricular, através a participação da autora nas consultas, bem como pela visualização e interpretação das respectivas fichas clínicas. No entanto, não foi possível obter alguma informação sobre alguns animais, pelo facto de serem animais errantes. Foram ainda obtidas as temperaturas atmosféricas dos meses em que a autora realizou o estágio curricular, através de consulta do site do Instituto Português de Meteorologia.

##### **1.2. Leishmaniose**

Entre 8 de Dezembro de 2008 e 28 de Fevereiro de 2009, o estágio curricular decorreu no Hospital Clínic Veterinari (HCV) de Barcelona, Espanha, onde foram observados vários casos de LCan. Durante este período foram observados 20 cães com Leishmaniose, em que 8 correspondiam ao sexo feminino e 12 ao sexo masculino. Destes 20 cães, 75% (15/20) foram diagnosticados em alturas distintas no HCV de Barcelona, enquanto que 25% (5/20), foram

diagnosticados em outras clínicas, que posteriormente referenciaram os casos para o HVC. De os 75%, 35% (7/15) foram diagnosticados durante o estágio curricular.

A pesquisa do agente etiológico foi efectuada através de métodos serológicos, essencialmente por cELISA (n= 15), IFI (n=5) e métodos moleculares, nomeadamente o RT-PCR (n=2) e PCR (n=2). O limiar de positividade de cELISA usado, foi de 14-21% (duvidoso), seguido de 21-80% (positivo baixo), 80-150% (positivo médio) e superior 150% (positivo alto). Adicionalmente, foram realizadas outras análises complementares, incluindo hemograma, bioquímicas sanguíneas, urianálise, proteinograma, análises citológicas e histopatológicas, bem como radiografias e ultrasonografias para as doenças concomitantes.

A informação obtida para a realização da componente prática desta dissertação, foi com base na visualização e interpretação das respectivas fichas clínicas. No entanto, como o HCV é um Hospital de Referência, nem sempre foi possível obter os dados dos cães diagnosticados em outras clínicas.

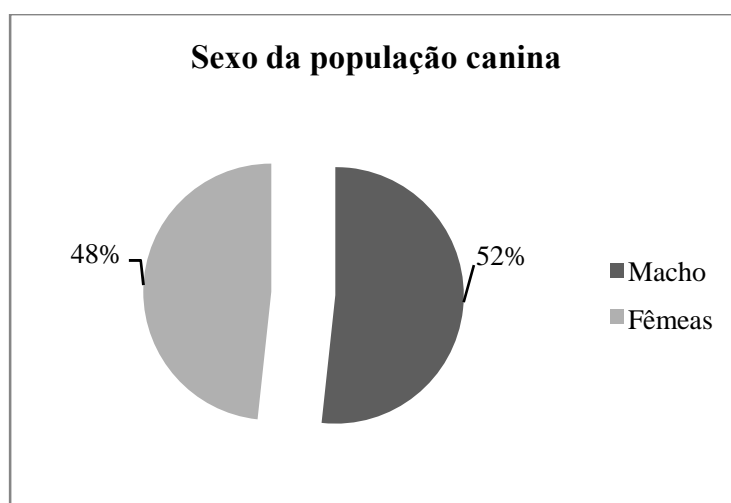
A análise de dados destas duas componentes, foi realizada com base em métodos de estatística descritiva (média, desvio padrão, moda, mediana, frequência absoluta e frequência relativa), utilizando o programa Excel da Microsoft<sup>®</sup>.

## 2. Resultados

### 2.1. Caracterização da amostra em estudo na Ilha da Madeira

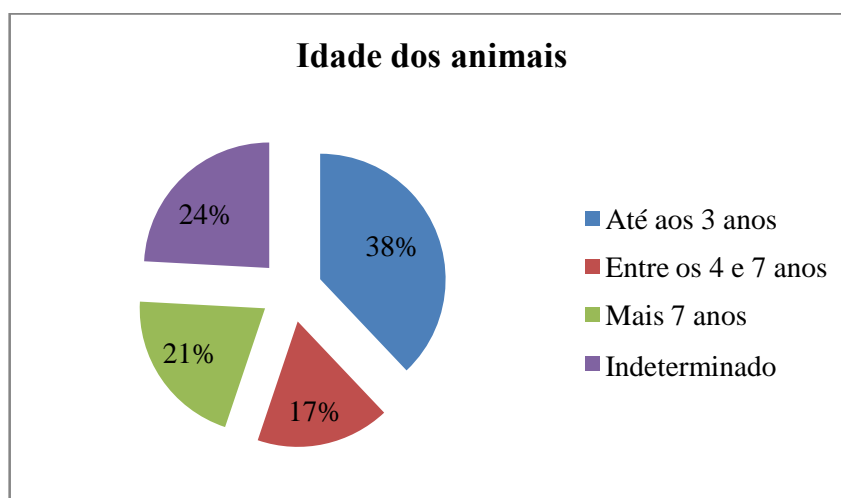
Na amostra total em estudo (n=29), 38% (11/29) eram animais errantes e 62% (18/19) animais com dono, sendo constituída por 52% (15/29) cães do sexo masculino e 48% (14/29) do sexo feminino (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Identificação do sexo da amostra em estudo, de acordo com a frequência relativa



Em relação à idade da amostra em estudo, a média foi de 4,8 anos, a moda de 2 anos e a mediana de 3,5 anos. No Gráfico 2, pode-se observar que grande parte da amostra testada (38%), apresentavam uma idade até aos 3 anos. O facto de 38% (11/29) da amostra total, serem animais errantes, não permitiu determinar a idade de 7 animais (24%). Relativamente aos animais errantes, 55% (6/11) da amostra eram do sexo masculino e 45% (5/11) do sexo feminino.

**Gráfico 2.** Frequência relativa (%) da idade dos animais



Na Tabela 6, pode-se observar a caracterização da amostra, com base na frequência absoluta e relativa. A prevalência de animais de raça indeterminada (52%), foi superior à prevalência dos animais de raça pura. Nesta categoria, o cão da Dalmácia foi a raça com maior prevalência, representando 10% (3/29) da amostra.



**Tabela 6.** Caracterização da amostra em estudo de acordo com a raça

<b>Raça determinada</b>	<b>n (%)</b>
Boxer	1 (3)
Caniche	1 (3)
Cocker Spaniel	1 (3)
Cão da Dalmácia	3 (10)
Husky Siberiano	2 (7)
Cão Pastor Alemão	2 (7)
Podengo Canariano	1 (3)
Retriever do Labrador	2 (7)
Shar-Pei	1 (3)
<b>Raça indeterminada</b>	<b>15 (52)</b>

Relativamente à zona de residência, 59% (17/29) residiam em zonas urbanas e 3% (1/29) numa zona rural. No entanto 38% (11/29) da amostra eram cães abandonados. A distribuição por concelhos e freguesias, pode ser visualizada na Tabela 7.

**Tabela 7.** Distribuição da amostra estudada por concelhos e freguesias da Ilha da Madeira

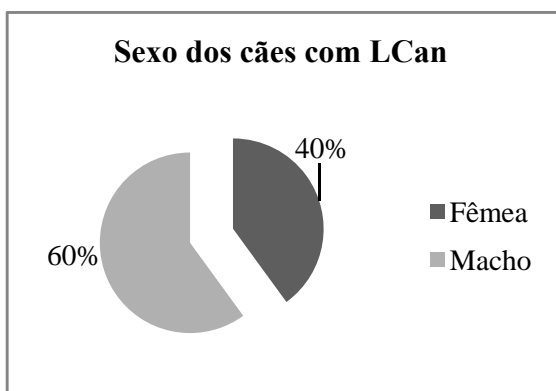
	<b>n (%)</b>
<b>Concelho do Funchal</b>	<b>14 (47)</b>
Monte	1(3)
S. António	1(3)
S. Gonçalo	2 (7)
S. Martinho	6 (20)
S. Roque	2 (7)
Sé	2 (7)
<b>Concelho de Santana</b>	<b>1 (3)</b>
Santana	1(3)
<b>Concelho de Santa Cruz</b>	<b>2 (7)</b>
Caníço	2 (7)
<b>Concelho do Porto Moniz</b>	<b>1(3)</b>
Seixal	1(3)
<b>Sem informação</b>	<b>11(40)</b>

No Funchal, no mês de Outubro a temperatura máxima foi de 28,2 °C, mínima de 14°C, com uma média de 21,1°C. No mês de Novembro a temperatura máxima foi de 24,5°C, mínima de 12,5°C e uma média de 18,5°C.

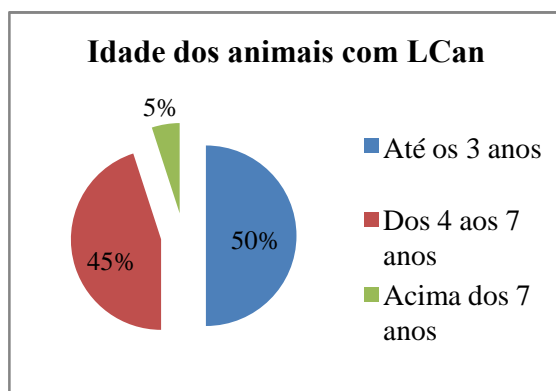
## 2.2. Caracterização da amostra em estudo em Barcelona

Na totalidade da amostra estudada em Barcelona (n=20), 60% (12/20) pertenciam ao sexo masculino e 40% (8/20) ao sexo feminino (Gráfico 3), com idades compreendidas numa média de 3,93, uma moda de 3 anos e numa mediana de 3,5 anos. Um dos 20 animais do presente estudo, não apresentava informação relativamente à sua idade. No entanto, verificou-se que 50% (10/20) dos animais apresentam-se com idade até aos 3 anos, enquanto que 45% (9/20) dos cães apresentavam uma idade compreendida entre quatro a sete anos, como está representado no Gráfico 4.

**Gráfico 3.** Identificação do sexo da amostra em estudo em Barcelona, com base na frequência relativa



**Gráfico 4.** Frequência relativa (%) da idade dos cães com leishmaniose



Na Tabela 8, pode-se observar a caracterização da amostra de acordo com a raça, tendo em conta a frequência relativa. Pode-se verificar que os cães de raça indeterminada estão representados numa percentagem de 20% (4/20), inferior aos cães de raça pura. Dentro desta classe, as raças Boxer, Bull Terrier e Yorkshire Terrier, destacam-se com uma prevalência de 15%, 10% e 10% respectivamente.

**Tabela 8.** Caracterização da amostra em estudo de acordo com a raça

	<u>n (%)</u>
<b>Raça determinada</b>	
Boieiro de Berna	1 (5)
Border Collie	1 (5)
Boxer	3 (15)
Bull Terrier	2 (10)
Bulldog Inglês	1 (5)
Dogue Alemão	1 (5)
Husky Siberiano	1 (5)
Pastor Alemão	1 (5)
Pinscher Miniatura	1 (5)
Schnauzer Miniatura	1 (5)
Yorkshire Terrier	2 (10)
<b>Raça indeterminada</b>	
	5 (25)

No que diz respeito à proveniência de cada animal, verificou-se que grande parte dos animais (65%) proveio da Região de Vallès Ocidental de Barcelona. Todas as regiões mencionadas na Tabela 9, pertencem à província de Barcelona, à região da Catalunha.

**Tabela 9.** Distribuição da amostra em estudo por regiões da Comunidade Autónoma de Espanha

<b>Regiões</b>	<u>n (%)</u>	<b>Regiões</b>	<u>n (%)</u>
<b>Bages</b>	<b>2 (10)</b>	<b>Vallès Ocidental</b>	<b>12 (65)</b>
Manresa	2 (10)	Castellar del Vallès	1 (5)
		Cerdanyola del Vallès	3 (15)
<b>Baix Llobregat</b>	<b>1 (5)</b>	Rubí	1 (5)
Sant Feliu de Llobregat	1 (5)	Sabadell	2 (10)
		Sant Cugat del Vallès	2 (10)
<b>Maresme</b>	<b>2 (10)</b>	Sentmenat	1 (5)
Alella	1 (5)	Terrassa	1 (5)
Dorsius	1 (5)	Ullastrell	1 (5)
		<b>Vallès Oriental</b>	<b>2 (10)</b>
		Caldes de Montbui	1 (5)
		Martorelles	1 (5)
		La Garriga	1 (5)

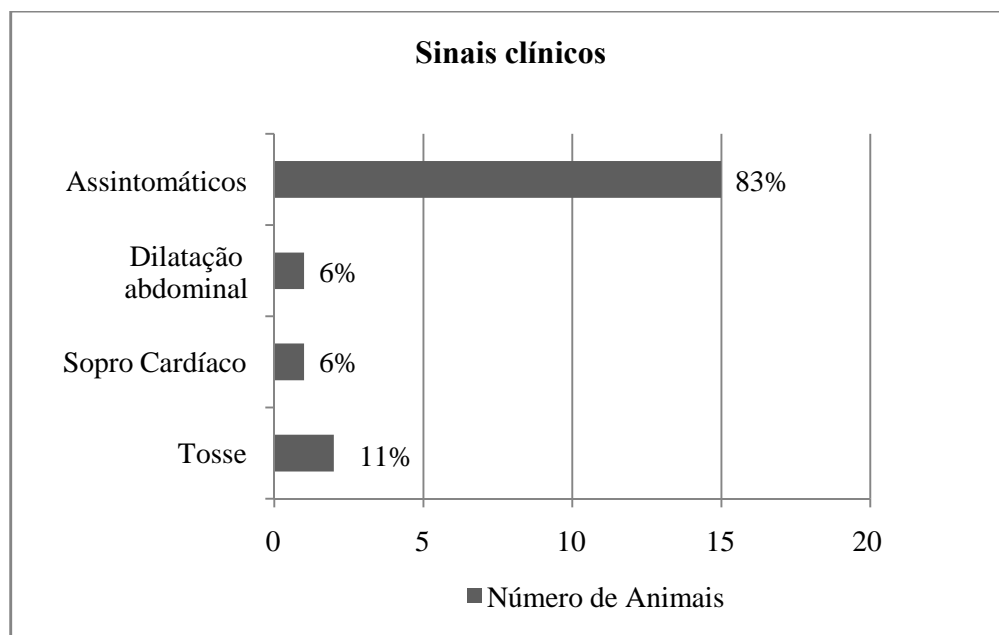
## 2.3. Estudo clínico

### 2.3.1. Dirofilariose

#### 2.3.1.1. Sinais clínicos

Os sinais clínicos verificados na amostra em estudo estão descritos no Gráfico 5.

**Gráfico 5.** Frequência absoluta e relativa dos sinais clínicos observados em 18 animais do presente estudo na Ilha da Madeira



Constatou-se que 83% (15/29) dos animais não manifestavam qualquer tipo de sintomatologia, quando submetidos aos testes de diagnóstico. O facto de 38% (11/29) da amostra, ser representada por animais errantes, impossibilitou saber a sua história clínica e sintomatologia, e como tal, não foram contabilizados para a realização do Gráfico 5.

#### 2.3.1.2. Exames complementares

Na Tabela 10 apresentam-se os resultados relativos ao hemograma realizado a cinco animais, com história clínica coincidente com uma infecção por *D. immitis*. Relativamente às alterações morfológicas hematológicas, verificou-se hipocromasia dos eritrócitos (20%), *rouleaux* eritrocitário (40%), equinócitos (20%), anisocitose eritrocitária (20%) e agregação plaquetária (20%). Verificou-se também uma diminuição dos valores de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito em 40% (2/5) da amostra. Dos cinco animais, 20% (1/5) apresentavam uma leucocitose com neutrofilia e linfopenia e, 20% (1/5) apenas uma eosinofilia.

**Tabela 10.** Resultados dos hemogramas de 5 animais

Parâmetro (intervalo de referência <sup>1</sup> )	Média	Mediana	Desvio Padrão	Máx	Mín	%↑	%↓
Eritrócitos (5,5 – 8,5 x 10 <sup>6</sup> /μl)	6,56	7,06	1,47	8,08	4,74	0	40
Hemoglobina (12 - 18 g/dl)	13,8	15,8	3,23	16,6	9,4	0	40
Hematócrito (37 - 55%)	41,94	45,6	10,86	52,9	27,5	0	40
VCM (60 -77 μm <sup>3</sup> )	63,46	64,5	3,16	66	58	0	20
HCM (10.5 - 24.5 pg)	21,02	20,8	0,99	22,5	19,9	0	0
CHCM (32 - 36 g/dl)	33,1	33,5	1,59	34,9	31,3	0	40
Plaquetas (200 - 500 x 10 <sup>3</sup> /μl)	258,6	257	102,61	370	104	0	20
Leucócitos (6 - 17 x 10 <sup>3</sup> /μl)	14,63	11,15	7,75	26,2	10	40	0
Nutrófilos segmentados (60 -70%)	63,67	66	18,61	81	44	40	0
Neutrófilos não segmentados (0 - 3%)	0,67	1	0,58	1	0	0	0
Linfócitos (12 - 30%)	16,98	16	7,93	30	9	0	20
Monócitos (3 - 10%)	6,56	6,8	4,16	11	0	0	0
Eosinófilos (2 - 10%)	10,4	6	8,91	25	4	20	0
Basófilos (Raros)	0	0	0	0	0	0	0

**Legenda:** (<sup>1</sup>De acordo com Aeillo, 1998); VCM – Volume Corpuscular Médio; HCM - Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; Máx – Máximo; Mín – Mínimo; % ↓ – percentagem de animais com o parâmetro diminuído; % ↑ – percentagem de animais com o parâmetro elevado;

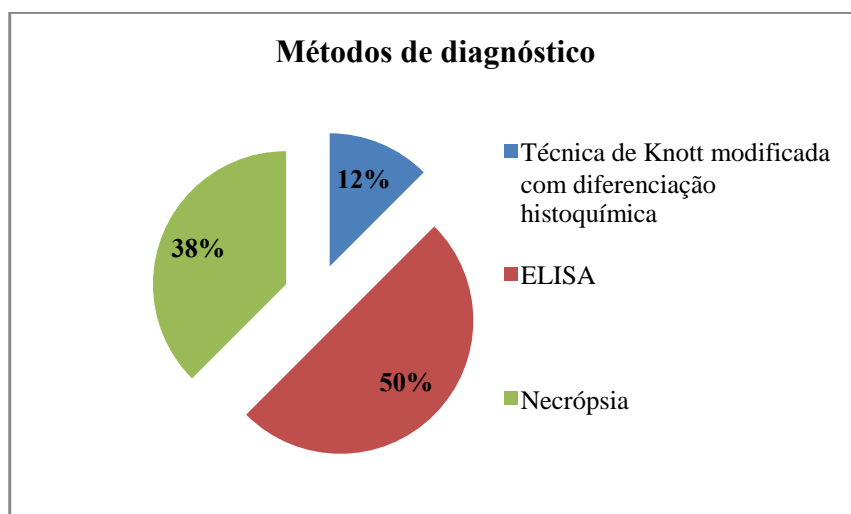
O exame radiográfico, realizado a um animal (3%), revelou um aumento do átrio direito e um desvio dorsal da traqueia. Adicionalmente, foi realizado um electrocardiograma a um dos 29 animais, que à auscultação apresentava um sopro cardíaco. No exame electrocardiográfico, apresentava um aumento da onda Q (1,5 mv) e uma arritmia respiratória, indicativos de um aumento do ventrículo direito.

### 2.3.1.3. Diagnóstico etiológico

O diagnóstico etiológico foi realizado por meio de métodos serológicos (ELISA), técnica de Knott modificada com diferenciação histoquímica e necrópsia. Vinte e cinco animais (86%) foram submetidos à técnica de Knott modificada e, apenas um (4%) à técnica de “gota a fresco”. Os restantes 10% (3/29) da amostra foram testados com ELISA. Dos 25 animais sujeitos à técnica de Knott modificada, apenas oito foram diagnosticados com dirofilariose através de *Kits* comerciais de ELISA, por diferenciação histoquímica e necrópsia.

No Gráfico 6 pode-se verificar a distribuição dos oito animais diagnosticados, de acordo com a frequência relativa do método de diagnóstico.

**Gráfico 6.** Distribuição da amostra com base na frequência relativa pelos métodos de diagnóstico



Na maioria dos casos apenas foi utilizada a técnica de Knott modificada, por motivos financeiros por parte dos proprietários e devido às regras vigentes na clínica. O facto de esta clínica ter um canil associado, por regra, apenas é realizada a técnica de Knott aos animais errantes e, de modo a evitar a propagação da doença, todos os animais positivos a esta técnica são eutanasiados.

#### 2.3.1.4. Terapêutica

O tratamento etiológico, foi aplicado a 72% (21/29) da amostra em estudo. Os restantes oito animais (38%), por serem animais errantes e positivos à técnica de Knott modificada, foram eutanasiados.

Apesar de apenas cinco animais terem sido diagnosticados com dirofilariose, a terapêutica instituída foi igual para todos os 21 animais, ainda que assintomáticos.

Relativamente à terapêutica implementada, foi utilizado um protocolo em duas injecções de Immiticide<sup>®</sup> (melarsomina). Inicialmente, 21 animais receberam um tratamento com Aspirina<sup>®</sup> (ácido acetilsalicílico) em conjunto com Ananase<sup>®</sup> (bromelaína) durante 14 dias, seguido de duas injecções de Immiticide<sup>®</sup> e Hostacortina<sup>®</sup> (acetato de prednisolona) com intervalo de 24 horas. Trinta dias após a segunda injecção de Immiticide<sup>®</sup> receberam uma última injecção de Ivertin<sup>®</sup> (ivermectina). Durante este período continuaram com Aspirina<sup>®</sup> e Ananase<sup>®</sup> até o fim da embalagem.

A dose da Ananase<sup>®</sup> utilizada foi de 2 mg/kg, PO, BID e, a dose da Aspirina<sup>®</sup> variou entre 5 a 10 mg/kg, PO, SID. Em relação à dose de Immiticide<sup>®</sup> utilizada, foi de 2,5 mg/kg, IM, nos músculos epixiais lombares. A Hostacortina<sup>®</sup> foi utilizada na dose de 1 mg/kg, IM e o Ivertin<sup>®</sup> na dose de 0,40 mg/kg, SC.

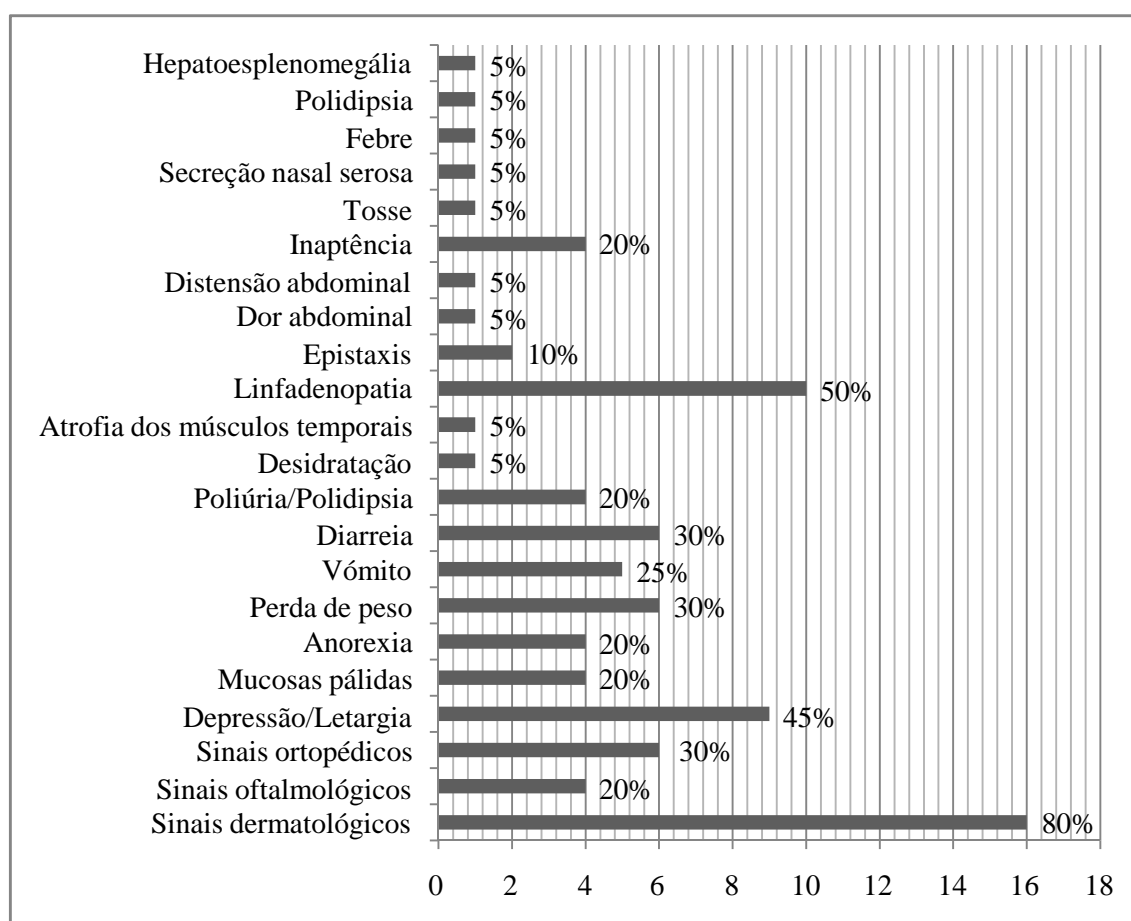
De modo a comprovarmos se a terapêutica foi bem sucedida, foi realizado a técnica de Knott modificada a todos os animais, 30 dias após a injeção de Ivertin<sup>®</sup>. Devido ao extenso período da terapêutica (75 dias), não foi possível obter os resultados de 11 animais (52%). Os restantes 10 animais (48%), obtiveram um resultado negativo à técnica de Knott modificada, tendo sido a terapêutica eficaz. Foi observada a remissão dos sintomas, dos poucos animais com sintomatologia e, a resolução das alterações laboratoriais nos animais assintomáticos.

### 2.3.2. Leishmaniose

#### 2.3.2.1. Sinais clínicos

No Gráfico 7, pode-se observar a diversidade de sinais clínicos observados nos 20 animais diagnosticados com leishmaniose canina, como consequência da própria doença ou, derivados de doenças concomitantes.

**Gráfico 7.** Frequência absoluta e relativa dos sinais clínicos observados nos 20 animais estudados



Considerando a amostra em estudo, 80% (16/20) dos animais desenvolveram sinais dermatológicos. Desta fracção populacional, evidenciaram-se como mais frequentes lesões do

tipo, uma dermatite queratoseborreica 7/16 (44%), em que 4/16 (25%) manifestavam um quadro difuso e 3/16 (19%) localizado e, seborreia seca em 4/16 (25%). Foram também observadas lesões cutâneas localizadas em zonas específicas, nomeadamente lesões ulcerativas (5/16 dos animais) focinho, cotovelos, tarso, almofadas plantares e pavilhão auricular. Destes 16 animais, 3 (19%) manifestavam eritema nos membros posteriores e cauda, no escroto e por toda a superfície corporal. Outras lesões, nomeadamente hiperqueratose do focinho (1/16), nódulos (2/16) e pápulas (2/16), também foram evidenciadas. Dos dois cães que apresentavam nódulos, um era consistente com o “cancro de inoculação” mas na zona ventral do pescoço.

Os sinais oftalmológicos presentes em 4 animais, podem ser visualizados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Sinais oftalmológicos presentes em quatro animais com LCan

<b>Sinais oftalmológicos</b>
Conjuntivite bilateral
Uveíte anterior do olho esquerdo
Meibomite bilateral
Blefarconjuntivite bilateral
Secreção seromucosa bilateral
Conjuntivite bilateral
Blefarite bilateral
Eritema da conjuntiva bilateral
Inflamação da glândula lacrimal do olho esquerdo
Edema da zona central da córnea no olho esquerdo

Adicionalmente, verificou-se que 30% (6/20) dos animais apresentavam sintomatologia ortopédica. Destes seis animais, três manifestavam claudicações, um com poliartrite, um com sinais de dor à locomoção e, um com debilidade motora.

Através do Gráfico 7 pode-se verificar que 50% (10/20) da amostra apresentavam um aumento de tamanho dos linfonodos. Destes, 50% (5/10) apresentavam linfadenopatia generalizada, 20% (2/10) apenas do linfonodo poplíteo, 10% (1/10) dos linfonodos poplíteo e submandibular, 10% (1/10) dos linfonodos pré-escapular e submandibular e, 10% (1/10) do linfonodo submandibular.

### **2.3.2.2. Exames complementares**

Foram realizados hemogramas e bioquímicas séricas a todos os animais, numa fase anterior ao diagnóstico etiológico e ao início da terapêutica e, numa fase posterior, de modo a monitorizar a evolução clínica. Na Tabela 12, apresentam-se os resultados do hemograma



realizado em 14 animais. Relativamente às alterações morfológicas hematológicas, verificou-se anisocitose eritrocitária (50%), policromasia (43%), *rouleaux* eritrocitário (43%), hipocromia (21%), eritoblastos (21%), poiquilócitos (14%), equinócitos (14%), dianócitos (7%), micrócitos (7%), equistócitos (7%), acantócitos (7%), estomatócitos (7%), anisocitose plaquetária (43%), agregação plaquetária (29%), macroplaquetas (21%) e linfócitos reactivos (29%).

**Tabela 12.** Resultados do hemograma de 14 animais e o seu respectivo estudo estatístico

Parâmetro (intervalo de referência <sup>1</sup> )	Média	Mediana	Desvio Padrão	Máx	Mín	%↑	%↓
Eritrócitos (5.5 - 8.5 x 10 <sup>6</sup> /μl)	5,67	5,89	1,26	7,98	2,48	0	36
Hemoglobina (12 - 18 g/dl)	12,78	13,2	3,25	18,7	5,6	7	43
Hematócrito (37 - 55%)	36,5	36,9	9,03	55	17	0	50
VCM (62 -77fl)	64,88	65,7	5,87	74,9	54	0	29
HCM (21,5 - 26,5 pg)	22,29	22,9	1,98	24,6	18,8	0	36
CHCM (33 - 37 g/dl)	34,25	34,3	1,48	35,3	33,2	0	0
Plaquetas (200 - 500 x 10 <sup>3</sup> /μl)	273,15	293	116,4	565	41	7	14
Leucócitos (6000 - 17000 μl)	9775	9045	4605	16910	2060	0	21
Linfócitos (12 - 30%)	22,01	21	11,37	47	5	7	14
Monócitos (3 - 10%)	6,36	6,5	3,18	12	2	14	7
Basófilos (0 -1%)	0,04	0	0,16	0,6	0	0	0
Eosinófilos (2 - 6%)	2,29	1,55	2,49	7	0	7	0
Neutrófilos segmentados (60 -75%)	69,16	69,5	11,59	85	42	43	0
Neutrófilos não segmentados (0 - 3%)	0	0	0	0	0	0	0

**Legenda:** (<sup>1</sup>De acordo com o Laboratório do Hospital Clínic Veterinari); VCM – Volume Corpuscular Médio; HCM - Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; Máx – Máximo; Mín – Mínimo; % ↓ – percentagem de animais com o parâmetro diminuído; % ↑ – percentagem de animais com o parâmetro elevado;

No que diz respeito às alterações ocorrentes nas bioquímicas séricas, estão referidas na Tabela 13.

**Tabela 13.** Alterações dos parâmetros bioquímicos dos animais com leishmaniose canina

Alteração	n/t (%)	Alteração	n/t(%)
Hiperproteinémia	10/20 (50)	Aumento da creatinina	4/20 (20)
Hipoalbuminémia	8/20 (40)	Aumento da ureia	3/20 (15)
Hiperglobulinémia	12/20 (60)	Aumento da ALT	3/20 (15)
Hipercolesterolémia	3/20 (15)	Aumento da FA	4/6 (67)

**Legenda:** ALT – Alanina aminotransferase; FAS – Fosfatase alcalina sérica

Verifica-se na Tabela 13, que as alterações bioquímicas séricas mais prevalentes neste estudo, consistiram numa hiperglobulinémia (60%) que está presente em 12/20, numa hiperproteinémia (50%) e numa hipoalbuminémia (40%).

Oito animais realizaram urianálises (tiras multistick), registando-se quatro casos de hematúria (+4 na tira de urina) e três casos de proteinúria (300 mg/dL). Destes oito animais, um apresentava uma proteinúria de 109 mg/dl. Foram também realizadas culturas de urina a dois destes animais. A realização da urianálise teve em conta vários motivos e objectivos. Num dos animais, foi realizada por este apresentar um aumento significativo dos níveis de creatinina, ureia, da creatinina quinase e estrangúria. Um outro, porque apresentava polidipsia/poliúria (PD/PU) e um aumento significativo da creatinina.

A ultrasonografia abdominal foi realizada a 30% (6/20) da amostra e foram observados alterações renais, hepáticas, esplénicas e do aparelho reprodutor. Dos animais submetidos a uma ultrasonografia, 50% (3/6) apresentavam alterações renais. Num caso foi observada a perda de definição entre a zona cortical e medular, zonas de hiperecogenicidade e um aumento da espessura da cortical. Observou-se também um caso de calcificações renais. Adicionalmente, também foi observado num outro caso, cálculos renais e vesicais.

Verificou-se alterações hepáticas em dois casos, consistentes com zonas de hiperecogenicidade no parênquima hepático e de uma hepatomegália. As alterações esplénicas observadas foram coerentes com uma suspeita de linfoma, em que o animal apresentava ecograficamente uma hepatoesplenomegália e uma hiperplasia do baço. Nos restantes animais, observou-se alterações no sistema reprodutor, consistentes com quistos paraprostáticos, quistos prostáticos e quistos nos ovários.

Foi realizado uma ultrasonografia cardíaca apenas a um animal e, verificou-se uma estenose da aorta e uma insuficiência da mitral.

Os exames radiográficos foram realizados a dois animais (10%), em que um apresentava comportamentos anormais, como picacismo e o outro, por ter associado à leishmaniose um linfoma, que radiograficamente apresentava um padrão alveolar com aumento do linfonodo supraesternal. Neste animal foi também realizado um electrocardiograma, indicando a presença de uma arritmia sinusal respiratória.

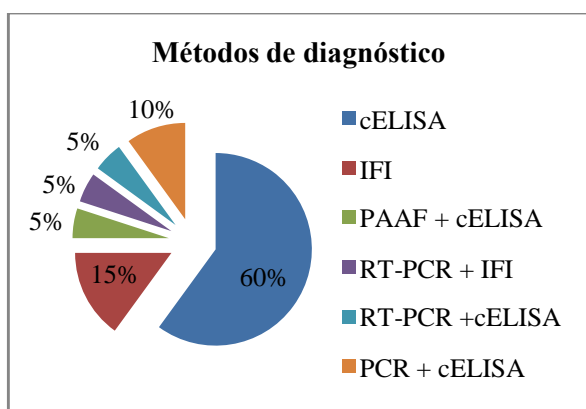
### **2.3.2.3. Diagnóstico etiológico**

Em relação ao diagnóstico, todos os animais foram diagnosticados através de pelo menos um método serológico. Em 15 animais (75%) foram efectuados técnicas de cELISA e em 5 (25%) por imunofluorescência indirecta (IFI) (Gráfico 8).

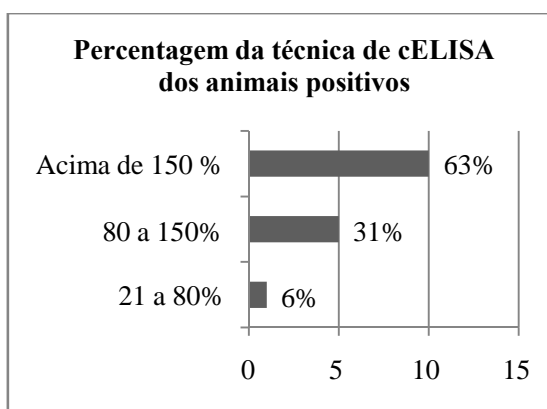
Dos animais que foram diagnosticados por cELISA, três animais foram diagnosticados em simultâneo por métodos moleculares (PCR e RT-PCR) e, um animal através de métodos parasitológicos, de visualização do parasita após PAAF do linfonodo poplíteo.

No Gráfico 9, verificamos que 63% dos cães apresentava uma percentagem superior a 150% à técnica de cELISA. Os animais diagnosticados através de IFI, apresentavam todos uma titulação superior a 320.

**Gráfico 8.** Distribuição da amostra por método de diagnóstico, com base na frequência relativa



**Gráfico 9.** Distribuição da amostra de acordo com a percentagem de resultados obtidos pela técnica de cELISA



#### 2.3.2.4. Doenças concomitantes

À exceção de 40% (8/20) dos animais com LCan, 12 animais (60%) apresentavam doenças concomitantes que estão descritas na Tabela 14.

**Tabela 14.** Distribuição das doenças concomitantes presentes nos 12 animais com LCan

Doença	n (%)	Doença	n (%)
Erliquiose	1 (9)	Quistos paraprostáticos	1 (9)
Insuficiência hepática	1 (9)	Quistos prostáticos	1 (9)
Insuficiência renal crónica	1 (9)	Quistos ováricos	1 (9)
Insuficiência cardíaca	1 (9)	Linfoma	1 (9)
Otite	2 (18)	<i>Miastenia gravis</i>	1 (9)
Dermatite por <i>Malassezia</i> spp.	2 (18)	Poliartrite	1 (9)
Hérnia perineal	1(9)	Pseudogestação	1 (9)
Pneumonia	1(9)	Otohematoma	1(9)

### 2.3.2.5. Terapêutica

A terapêutica etiológica, não foi apenas realizada a um animal, devido à não comparecimento dos proprietários à consulta, após o estabelecimento do diagnóstico de LCan. Realizou-se assim a terapêutica etiológica a 95% da amostra (19/20).

Relativamente a terapêutica da leishmaniose, 15 animais (79%) receberam um tratamento com Glucantime<sup>®</sup> (Antimoniato de meglumina) associado ao Zyloric<sup>®</sup> (Alopurinol) e apenas 11% (2/19) com apenas Glucantime<sup>®</sup>. Adicionalmente, 5% (1/19) receberam um tratamento com Zyloric<sup>®</sup> e Milteforan<sup>®</sup> (metilfosina) e outros 5% (1/19) com Zyloric<sup>®</sup> e Marbocil<sup>®</sup> (Marbofloxcina).

A dose do Zyloric<sup>®</sup> utilizada foi de 10 mg/kg, PO, BID, com uma duração mínima de um a seis meses, consoante o estado clínico do paciente, a indefinidamente. Tendo em conta ao Glucantime<sup>®</sup>, 12 animais receberam esta terapêutica, numa dose de 75 – 100 mg/Kg, SC, SID e apenas 3 animais na dose de 100 mg/kg, SC, SID. Porém, dois animais receberam o Glucantime<sup>®</sup> com uma dose de 80 mg/kg, SC, BID e 50 mg/kg, SC, BID, respectivamente. Em relação à duração de administração deste fármaco, variou entre 20 dias a 30 dias, em que 16/19 animais (84%) receberam durante 30 dias.

A dose de Milteforan<sup>®</sup> utilizada foi de 2 mg/kg, PO, durante 28 dias. Quanto ao Marbocil<sup>®</sup>, não foi possível saber qual a dose administrada, tendo em conta que esta terapêutica foi implementada noutra clínica veterinária.

Adicionalmente, foi realizada uma terapêutica de suporte quando necessária, dirigida às complicações da própria doença, assim como para as doenças concomitantes, respectivas.

Dos 19 animais submetidos à terapêutica etiológica, 63% (12/19) apresentaram uma cura clínica com redução da sintomatologia e das alterações laboratoriais. Cinco animais (26%), não responderam bem à terapêutica, por ocorrência de lapsos na administração dos fármacos por parte dos proprietários, devido a complicações graves da própria doença ou não responderem à terapêutica implementada. Em relação aos restantes dois animais (11%), não foi possível saber a evolução terapêutica, por terem apenas iniciado a terapêutica em Fevereiro de 2009.

### **3. Discussão**

O estudo retrospectivo de dirofilariose foi efectuado numa amostra de 29 animais da Ilha da Madeira, enquanto que o estudo retrospectivo de leishmaniose foi efectuado em 20 animais de Barcelona, Espanha. O número reduzido de elementos de cada amostra em estudo, é um factor limitante, não sendo possível retirar conclusões lícitas sobre a prevalência da amostra, no entanto, permitiu tirar algumas conclusões válidas quanto à amostra.

#### **3.1. Dirofilariose**

Neste estudo, a amostra do sexo masculino está ligeiramente mais representada (52%) do que a do sexo feminino (48%), em que 6 animais (21%) do sexo masculino, são animais errantes. Pereira da Fonseca et al. (1991) referem que os animais do sexo masculino estão mais predispostos a serem infectados, por estarem mais expostos ao vector. Cães de grande porte e que vivem no exterior das habitações apresentam um risco acrescido em relação aos cães que vivem no interior (Kienle & Kittleson, 1998; Calvert & Thomason 2008). Kienle & Kittleson (1998) afirmam que o rácio entre macho-fêmea é de 2 para 4:1, respectivamente.

Verificou-se que 38% dos animais tinham idade até inferior a três anos. Este facto poderá não ser significativo, sabendo que não foi possível saber a idade de 24% da amostra. No entanto, Kienle & Kittleson (1998) afirmam que a doença ocorre comumente em animais entre os 4 e 7 anos, mas que em zonas endémicas, é possível observá-la em animais mais novos.

A proporção de cães de raça determinada foi de 48% e de raça indeterminada 52%, em que a raça mais frequente, foi o cão da Dalmácia, com 10% (3/29). Apesar desta ocorrência, Kienle & Kittleson (1998) e Pereira da Fonseca et al. (1991), referem que o tipo de pelagem e a raça do animal, não aparentam ter qualquer influência na prevalência de dirofilariose canina.

Relativamente à localização, constatou-se uma maior proporção de infecção (47%) na amostra, residente no concelho do Funchal. Este facto, pode ser justificado, pela Clínica SPAD localizar-se neste mesmo concelho, sendo mais facilmente recorrida pelos proprietários. Estudos anteriores, afirmam que a prevalência de cães microfilarémicos na Ilha da Madeira é de 30% (Fonseca et al., 1991; Genchi et al., 2005).

O facto da temperatura ambiental no Funchal variar entre 28,2 °C e 12,5 °C entre o mês de Outubro e Novembro, é um factor importante para o desenvolvimento dos vectores e para a maturação do parasita no seu interior, consentindo com as afirmações de Kienle & Kittleson (1998) e Genchi et al. (2009).

Na amostra estudada, 83% (15/18) foram assintomáticos, concordando com Atkins (2005) que afirma, que na maioria dos casos, os animais são assintomáticos. Tendo em conta que estes animais foram diagnosticados nos meses de Outubro e Novembro e, que a maioria dos animais não apresentavam sintomatologia, pensa-se que podiam tratar-se de casos realmente

assintomáticos ou de animais que foram infectados durante o Verão, que vieram a manifestar sintomatologia após o período pré-patente de 6 meses. Atkins (2005) afirma que os cães apenas manifestam sinais de doença quando as artérias pulmonares e os pulmões estão afectados.

Relativamente aos sinais clínicos, constatou-se que um animal manifestava um único sintoma, um sopro cardíaco, indicador de uma possível infecção por *D. immitis*. Dos restantes animais que apresentavam sintomatologia, dois apresentavam tosse e, um último, distensão abdominal. Os sinais clínicos variam consoante a duração e a gravidade da infecção. A maioria dos animais com sintomatologia, apresentam um quadro clínico crónico, reflectindo a presença de nemátodes adultos nas artérias pulmonares e no coração (Ferasin & Knight, 2005; Atkins, 2005).

Na maioria dos casos, os sinais relatados na história clínica e observados ao exame físico são muito variáveis, entre eles, intolerância ao exercício, perda de peso, tosse, má condição corporal e distensão abdominal (Atkins, 2005). A ausência de sinais patognomónicos, dificulta o diagnóstico e, torna importante fazer detalhadamente a história pregressa e efectuar um exame físico pormenorizado.

A realização de exames complementares revelou como principais alterações hematológicas, anemia (40%), trombocitopenia (20%), neutrofilia (40%), linfopenia (20%) e eosinofilia (20%). Os exames complementares foram apenas realizados a cinco animais e apenas dois apresentavam uma anemia. A alteração hematológica mais consistente, foi uma anemia, com a diminuição dos valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. A anemia desenvolvida por um cão, apresentava os valores do VCM e CHCM normais, indicando uma anemia não regenerativa (normocítica e normocrómica), que ocorre em 10% dos animais com infecções médias e em 60% dos animais com infecções crónicas (Kienle & Kittleson, 1998; Atkins 2005). O outro canídeo com anemia, apresentava os valores de VCM diminuídos e CHCM normais, com alteração morfológica eritrocitária, com *rouleaux* eritrocitário e raros reticulócitos, indicando uma anemia não regenerativa (microcítica e normocrómica), característica de uma doença inflamatória crónica (Day, Mackin, Littlewood, 2000).

A presença de uma agregação plaquetária, torna a interpretação da trombocitopenia subjectiva, não sendo possível confirmar a existência de uma verdadeira trombocitopenia (Day et al., 2000). Alguns autores referem ser comum a ocorrência de uma trombocitopenia em animais com CID, uma a duas semanas após a terapêutica adulticida (Atkins, 2005; Ware, 2007). Por outro lado, Calvert & Thomason (2008), afirmam que os cães com síndrome da veia cava ou com um tromboembolismo grave, podem manifestar uma trombocitopenia associada a uma hemoglobinúria.

No leucograma também foi presenciado uma leucocitose associada a uma neutrofilia em 2 animais, apontando para a existência de um processo inflamatório agudo ou crónico, acordando com a afirmação validada por Atkins, (2005), que 20% a 60% dos animais apresentam uma neutrofilia. A linfopénia pode ser causada por vários factores, como, uma infecção, uma destruição de tecidos linfóides, a presença de tumores linfóides (*e.g.* linfossarcoma) ou pela acção de glucocorticoides (Rebar, MacWilliams & Feldman, 2005). Pensa-se que a causa mais plausível para a manifestação hematológica de uma linfopénia num cão com dirofilariose, seja uma infecção. Atkins, (2005) afirma ser comum a existência de uma eosinofilia em 85% dos cães com dirofilariose, o que corrobora a alteração encontrada no nosso estudo. Kienle & Kittleson (1998) referem que a eosinofilia é comum em 85% dos cães microfilarémicos e em 95% dos cães amicrofilarémicos, devido à destruição imunológica das microfilárias.

A alteração no electrocardiograma, um aumento da onda Q nas derivações I, II e III e superior a 0,5 mv no aVF, sugere haver um aumento do ventrículo direito, que é uma das alterações observadas num cão com dirofilariose (Tilley, Tilley & Tilley, 1992; Atkins, 2005).

As alterações radiográficas, observadas em 3% (1/29) da amostra, podem ter várias interpretações. O aumento do átrio direito pode ter como causa, uma insuficiência da tricúspide, uma cardiomiopatia, um tumor no átrio direito e *cor pulmonale*. Os diagnósticos diferenciais possíveis para esta alteração radiográfica, incluem: linfadenopatia hilar, tumor na base do coração (*e.g.* quemodectoma), tumor no mediastino cranial ou uma sobreposição da artéria pulmonar ou da aorta quando aumentadas de tamanho (Owens & Biery, 1999). Atkins (2005) referem que as alterações radiográficas desenvolvidas caracterizam-se por um aumento do tamanho do lado direito do coração, aumento proeminente da artéria pulmonar, aumento do tamanho e da densidade das artérias pulmonares e da tortuosidade das artérias pulmonares. No que se refere ao método de diagnóstico utilizado, constatou-se que a técnica de Knott modificada foi realizada em 86% da amostra. É uma técnica rápida, fácil de realizar e económica, que permite a identificação do parasita. No entanto, é uma técnica limitante, pelo facto de ser necessário um técnico experiente para a identificação do parasita de acordo com as suas características morfológicas (Ferasin & Knight, 2005; Carvalho & Santos, 2006). Por ser uma técnica insensível e inespecífica, quando utilizada, deve ser realizada em conjunto com outros métodos de diagnóstico mais específicos e sensíveis, como a técnica de ELISA. Em sua desvantagem, a técnica de ELISA só permite detectar antígenos de fêmeas adultas e podem gerar falsos negativos durante os primeiros 5 a 8 meses de cada infecção, quando apenas estão infectados por nemátodes do mesmo sexo e, em infecções com uma carga parasitária baixa (AHS, 2005; Ferasin & Knight, 2005; Atkins, 2005; Ware, 2007). A

eutanásia dos oito animais errantes (38%), foi realizada, pelo facto de serem positivos à técnica de Knott modificada e como tal, considerados como potenciais hospedeiros capazes de transmitir o parasita aos vectores.

Da amostra estudada, apenas oito animais foram diagnosticados com dirofilariose. Na opinião da autora, devido à existência de um elevado número de animais assintomáticos, o diagnóstico deve ser realizado com base, numa história clínica detalhada, no quadro clínico e laboratorial e com a utilização de pelo menos dois métodos de diagnóstico, através da identificação das microfilárias coradas com fosfatase ácida, após a sua concentração pela técnica de Knott modificada e, através da pesquisa de anticorpos por métodos serológicos.

No que concerne à terapêutica instituída, verificou-se que o protocolo terapêutico implementado a 72% (21/29) da amostra em estudo, foi também realizado aos 16 animais microfilarémicos. Esta abordagem por parte da clínica, é realizada por precaução e com finalidade de eliminar as possíveis filárias adultas e microfilárias existentes nos animais assintomáticos.

O protocolo utilizado pela clínica é realizado em qualquer fase da doença e é consistente com o protocolo *standard*, duas injeções separadas de 24 horas. No entanto, o AHS (2005) afirma que o uso do protocolo alternativo, com eliminação das filárias em duas fases separadas por 4 a 6 semanas, em qualquer fase da doença, é mais seguro e vantajoso. A dose de melarsomina (Immiticide<sup>®</sup>) utilizada foi de 2,5 mg/kg, IM, como a recomendada por Atkins (2005). Em conjunto, foi administrado um corticosteróide, Hostacortina<sup>®</sup> (acetato de prednisolona) na dose de 1 mg/kg, que corrobora a dose recomendada entre 1 a 2 mg/kg, SID (Atkins, 2005).

Apesar de a Aspirina<sup>®</sup> apresentar uma acção anti-trombótica, o AHS (2005), Atkins (2005) e Ware (2007), afirmam não existir qualquer benefício quando utilizada. No entanto, Atkins (2005) afirmam que quando usada, deve ser administrada diariamente durante 1 a 3 semanas antes do tratamento adulticida e durante 4 a 6 semanas após o tratamento.

A temperatura ambiente revela ser um factor importante na transmissão da doença. Kienle e Kittleson (1998) referem que as larvas necessitam de uma temperatura ambiental superior a 14°C para o seu desenvolvimento. Segundo Genchi et al. (2009) a transmissão sazonal da dirofilariose na Europa, ocorre durante o verão, entre o mês de Junho e Setembro. Apesar da transmissão da dirofilariose ocorrer entre os meses referidos, nos meses de Outubro e Novembro na Ilha da Madeira, foram registadas temperaturas ambientais propícias para o desenvolvimento do vector e das larvas.

É de salientar que as restrições financeiras de muitos proprietários impossibilitaram, a realização de alguns exames específicos de diagnóstico, os quais eram importantes para estabelecer um diagnóstico definitivo. É preciso sensibilizar os proprietários para necessidade



da prevenção contra os insectos culicídeos, de modo a reduzir a incidência de animais infectados. Contudo, parece que esta questão não é seriamente encarada pelos proprietários, talvez por desconhecimento da doença ou por factores económicos.

### 3.1.2. Leishmaniose

O sexo masculino, representa 60% da amostra estudada, no entanto alguns autores referem não existir uma predisposição sexual na LCan (Miranda et al., 2008). Contudo, Miranda et al. (2008) referem que alguns autores afirmam existir uma maior predisposição em animais do sexo masculino.

Relativamente à idade, verificou-se que 50% (10/20) dos cães apresentavam idade até aos 3 anos e 45% (9/20) uma idade compreendida entre quatro a sete anos. A amostra representada nos 50%, apresentavam idade com uma média de 3,93 anos, moda de 3 anos e numa mediana de 3,5 anos. Esta situação pode ser explicada, pelo facto de os animais jovens possuírem um sistema imunitário mais vulnerável, que os tornam mais susceptíveis a qualquer tipo de infecção. É possível que os animais mais sensíveis venham a desenvolver a doença numa idade prematura, enquanto outros, podem ser resistentes, e mesmo sendo infectados enquanto jovens, podem não desenvolver a doença até quando forem mais velhos (Miranda et al., 2008). Apesar disto, a LCan é uma doença crónica, em que os sintomas clínicos desenvolvem-se entre 3 meses a 7 anos (Baneth, 2006). Segundo Alexandre-Pires e Correia (2008) após a infecção, o período de incubação até ao aparecimento dos primeiros sintomas, pode variar entre 1 mês e 3 anos. Miranda et al. (2008) e Mendão (2009) declaram existir uma distribuição bimodal da idade dos animais com leishmaniose, em que o primeiro pico é entre dois a quatro anos e o segundo, superior a sete anos. Além do sistema imunitário dos animais, outros factores podem influenciar a doença, incluindo entre outros, a existência de doenças concomitantes, infecções recorrentes e o estado nutricional (Mendão, 2009).

As raças Boxer, Bull Terrier e Yorkshire Terrier, encontram-se mais representadas neste estudo: 15%, 10% e 10%, respectivamente. Todas as raças são susceptíveis à infecção por *Leishmania* (Solano-Gallego et al., 2000; Alvar et al., 2004; Alves et al., 2009). Todavia, algumas raças são mais afectadas do que outras; a raça Boxer é uma delas. Outros autores, referem que as raças Boxer, Dobermann e Pastor Alemão estão mais predispostas, o que também é sugerido pelo nosso estudo. Os cães de grande porte e que vivem no exterior das habitações, por longo tempo expostos ao vector, estão mais predispostos a serem infectados (Lima-Netto, 2000).

Todos os animais investigados residiam na Catalunha, na província de Barcelona. Corrales e Moreno (2006) referem que a prevalência na Catalunha varia entre 9 a 18%. A razão pelo

qual, a prevalência nesta Comunidade Autónoma é elevada, pode deve-se ao facto do HCV ser um hospital de referência e, por estar localizado na região Vâlles de Ocidental, onde reside 65% da amostra.

A manifestação clínica da LCan é muito variável, devido à multiplicidade dos mecanismos patogénicos e das respostas imunitárias individuais (Moreno et al., 1999; Lima-Netto, 2000). Geralmente, apresenta um quadro insidioso e progressivo, em que numa fase inicial observa-se uma alteração do estado geral, com perda de peso e depressão (Moreno et al., 1999; Alvar et al., 2004). Como pode-se comprovar, 45% dos animais apresentavam-se à consulta com depressão/letargia, 30% com perda de peso e 20% anorécticos.

A sintomatologia dermatológica mais prevalente nos 16 animais com um quadro dermatológico, foi nomeadamente uma dermatite queratoseborreica, seborreia seca, lesões cutâneas ulcerativas sem tendência para a cicatrização e alopecias periorbitais. Um dos 20 animais com LCan, apresentava como lesão única, um nódulo na região ventral do pescoço, semelhante ao “cancro de inoculação”, resultante da picada do flébotomo. No entanto, Blavier et al. (2001) e Alexandre-Pires e Correia (2008) referem que a lesão nodular conhecida por “cancro de inoculação” ocorre comumente, na ponta do nariz ou na face interna do pavilhão auricular. Alvar et al. (2004) e Baneth (2006) afirmam que 65% a 90% dos animais com leishmaniose, apresentam um quadro cutâneo, idêntico aos nossos resultados. As lesões dermatológicas observadas são corroborantes com as lesões descritas na literatura (Fraile et al., 2001; Rochetle, 2003; Corrales & Moreno, 2006; Alexandre-Pires & Correia, 2008). Apesar de não estar presente na panóplia de sinais clínicos da amostra estudada, a onicogribose é um achado específico que ocorre numa pequena proporção dos cães seropositivos (Baneth, 2006; Carvalho & Santos, 2006; Aguiar et al., 2007; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Constatou-se que 50% dos cães apresentavam uma linfadenopatia. Destes, 40% (oito animais) apresentavam uma linfadenopatia do linfonodo poplíteo ou uma linfadenopatia generalizada. Esta alteração pode afectar apenas um linfonodo, contudo, é mais comum haver uma linfadenomegália generalizada, com um aumento do tamanho e consistência dos linfonodos superficiais, especialmente dos poplíteos, pré-escapulares e dos sub-maxilares (Moreno et al., 1999; Roze, 2005; Baneth, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Em 30% da amostra com lesões ortopédicas, a claudicação era o sinal mais prevalente, estando de acordo com a afirmação de Pereira da Fonseca e Villa de Brito (2008). Um dos seis animais com alterações na locomoção, com 7 anos de idade, apresentava uma poliartrite. Segundo Santos et al., (2006) a poliartrite é consistente com uma inflamação granulomatosa da sinóvia devido à presença do parasita ou por uma deposição de complexos imunes na

sinóvia, produzindo uma reacção de hipersensibilidade do tipo III, que atrai os neutrófilos e lesão da articulação por enzimas hidrolíticas.

Das afecções oculares apresentadas pelos quatro animais (20% da amostra), destacaram-se os processos inflamatórios como conjuntivite, blefarite, meibomite e uveíte, o que está de acordo com Roze (2005). Alexandre-Pires e Correia (2008) mencionam que pode ocorrer uma inflamação das glândulas lacrimais principais e acessórias, o que é corroborado pelo nosso estudo. As lesões oculares são polimórficas, sendo algumas muito discretas, no entanto, os tecidos mais irrigados são a sede das lesões de origem imunológica mais graves (Alexandre-Pires & Correia, 2008). Estes autores também referem que as lesões oculares podem surgir por acção do parasita ou por processos imunológicos, que levam à formação de depósitos de complexos imunes.

Sinais de polidipsia e poliúria foram observados em cinco animais. A PU/PD pode ter várias causas, entre muitas, insuficiência hepática, insuficiência renal, doença endócrina, dieta, neoplasia (Gough, 2007). Verificou-se um aumento dos valores renais em dois animais com PU/PD, indicando como principal causa uma insuficiência renal. Num destes dois animais foi diagnosticado uma insuficiência renal crónica de grau IV, enquanto que o outro, apresentava calcificações renais. Relativamente aos outros três animais, dois com PU/PD foram casos pontuais e que desapareceram após a instituição da terapêutica contra a LCan. Pereira da Fonseca & Villa de Brito (2008) afirmam que os sinais clínicos desenvolvidos devido à insuficiência renal crónica, resultam de uma glomerulo-nefrite e/ou nefrite túbulo-intersticial.

Os sinais gastrointestinais observados, vômito e diarreia, ocorreram em 25% e 30% da amostra, respectivamente. Pensa-se que os sinais gastrointestinais apresentados por três animais, deveram-se as doenças concomitantes que apresentavam, como uma insuficiência renal crónica, insuficiência hepática e linfoma. Os restantes três animais, apresentavam diarreia com muco e hematoquézia, indicativo de ser uma doença de intestino grosso e vômitos esporádicos. Adamama-Moraitou et al. (2007) afirmam que a presença da *Leishmania* na mucosa do cólon é bastante elevada, principalmente em cães sem sintomatologia aparente de colite, concluindo assim, que a LCan pode ser responsável por alguns casos de colite crónica, pelo menos em zonas endémicas.

Baneth (2005) e Pereira da Fonseca & Villa de Brito (2008) afirmam que as lesões nasais podem evoluir de uma rinite serosa com fluxo não muito abundante, mas contínuo, a uma rinite mucopurulenta e a uma epistáxis unilateral ou bilateral, o que observámos.

A realização de exames complementares revelou como alterações hematológicas, anemia (43%), neutrofilia (43%), leucopenia (21%), trombocitopenia (14%), linfopenia (14%), monocitose (14%), linfocitose (7%), trombocitose (7%) e eosinofilia (7%). Todos os animais

com os valores dos eritrócitos, hematócrito e hemoglobina diminuídos, apresentavam anemia. Os cães que desenvolveram anemia com o decorrer da doença, apresentavam os valores de VCM e CHCM dentro dos padrões normais, sugerindo uma anemia não regenerativa normocítica e normocrômica, facto verificado por vários autores na LCan (Moreno et al., 1999; Roze 2005; Corrales & Moreno, 2006; Baneth, 2006; Reis e tal., 2006; Dias et al., 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Um dos animais com anemia apresentava os valores do VCM diminuídos e CHCM normal, indicando uma anemia não regenerativa microcítica e normocrômica associada a uma deficiência de ferro. Pensa-se, que por apresentar uma insuficiência renal crónica de grau IV, apresentava uma diminuição da concentração do ferro no soro e da saturação de transferrina. No entanto, ainda não está claro se a causa desta deficiência foi devida a uma diminuição da ingestão de ferro, da alteração da sua absorção ou por uma perda excessiva de ferro (Day et al., 2000). Apresentava também uma anisocitose eritrocitária, micrócitos, equistócitos, acantócitos e com inclusões de Howell-Jolly. Considera-se que estas alterações eritrocitárias estejam relacionadas com microangiopatias ou com hepatopatias. Entre todos os animais com anemia, apenas um apresentava os valores de VCM diminuídos e CHCM normais, indicando uma anemia regenerativa microcítica e normocrômica.

As principais alterações observadas no leucograma, uma leucopénia, linfopénia e trombocitopénia, o que está confirmado por Moreno et al. (1991) e Baneth (2005). Reis et al. (2006) afirmam que esta leucopénia deve-se a um mecanismo multifactorial, em que há diminuição da hematopoiese devido uma disfunção medular, afectada pelo intenso parasitismo da medula óssea, como também pelo recrutamento e enclausuramento de leucócitos em diferentes órgãos ou devido à produção de citocinas supressoras. Alguns autores afirmam ser possível encontrar uma leucocitose com neutrofilia (Moreno et al. 1991). No entanto é mais comum existir uma leucopénia com linfopénia e diminuição dos monócitos e eosinófilos (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Estes autores afirmam que a trombocitopénia pode ocorrer em animais com LCan, confirmando os nossos resultados.

A eosinofilia encontrada em um caso, pode ter origem numa infecção parasitária ou numa reacção de hipersensibilidade, sendo esta última a mais plausível para este caso em particular. Relativamente à linfocitose presente num animal, pode ter sido causada por uma infecção crónica, com base numa resposta imunitária. A trombocitose observada, que pode ser ocasionada por uma contracção esplénica devido à ansiedade, exercício, trauma, a uma resposta após uma trombocitopénia ou, a uma trombocitose reactiva, devido a reacções inflamatórias, infecções, neoplasias, hemorragias crónicas, hiperadrenocorticismismo ou pela administração de glucocorticóides (Rebar et al., 2005).

No que concerne às alterações bioquímicas, as alterações mais prevalentes foram uma hiperglobulinémia (60%), hiperproteinémia (50%) e hipoalbuminémia (40%), que corroboram com as afirmações de vários autores (McGrotty & Tennant, 2005; Baneth, 2006; Reis e tal., 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Em relação ao proteinograma, verificou-se um aumento das globulinas, especialmente das  $\gamma$  e  $\beta$  em sete animais, das  $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\alpha 2$  em cinco animais e outros animais com um aumento individual, quer da  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\alpha 2$ . Grande parte dos animais apresentava uma proteinograma com uma gamopatia policlonal, que traduziu-se por um aumento de pelo menos as proteínas  $\gamma$  e  $\beta$ . Numa resposta inicial predomina a produção de IgM. No entanto, os antigénios expostos estimulam uma resposta mais rápida por parte das células de memória dos linfócitos B, com produção de IgG. Apesar de não ser tão comum, também é possível observar uma gamopatia monoclonal em cães com leishmaniose (McGrotty & Tennant, 2005). Os proteinogramas foram realizados aos 20 animais, com objectivo de auxiliar no diagnóstico, antes da instituição de uma terapêutica e no controlo da doença.

Apesar de 35% da amostra apresentar um aumento dos valores de ureia e creatinina, apenas em um animal foi diagnosticado uma insuficiência renal crónica e em outro com calcificações renais. Foram também observadas alterações a nível dos parâmetros hepáticos, contudo, apenas um animal foi diagnosticado com uma insuficiência hepática, que tanto podia estar associada à leishmaniose ou como ser uma hepatopatia isolada.

Os resultados obtidos através da interpretação das tiras de urina, revelaram que 50% dos animais apresentavam hematúria e 38% proteinúria. Estas alterações são sugestivas de um possível desenvolvimento de uma doença renal. A doença renal mais comum em LCan, é a glomerulonefrite membranosa proliferativa devido à deposição de complexos imunes (Moreno et al., 1999). Estas lesões podem evoluir e originar uma insuficiência renal crónica (Blavier et al., 2001; Baneth, 2006; Corrales & Moreno, 2006).

Os resultados das ultrasonografias e radiografias realizadas, são difíceis de avaliar na amostra em estudo, por não terem sido realizadas uniformemente em todos os animais. É de salientar dois casos em que os animais apresentavam uma sintomatologia característica e através da ultrasonografia, foi possível diagnosticar uma insuficiência renal crónica associada à leishmaniose e uma insuficiência hepática. Num dos casos foi observada uma perda de definição entre a zona cortical e medular, zonas de hiperecogenicidade e um aumento da espessura da cortical e outro com zonas de hiperecogenicidade no parênquima hepático.

No que concerne ao método de diagnóstico, verificou-se que o método mais utilizado foi a técnica de cELISA com pesquisa de anticorpos específicos (75%). Todos os animais apresentados à consulta, apresentavam uma suspeita clínica, com um quadro clínico

característico da leishmaniose. As alterações laboratoriais observadas, ajudaram a reforçar a suspeita clínica e a direccionar o plano de diagnóstico. Vários autores, afirmam que deve-se ter em consideração os dados clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e bioquímicos, em conjunto, de modo a direccionar e facilitar o diagnóstico (Moreno et al., 1999; Alvar et al., 2004; Maia, 2005; Corrales & Moreno, 2006).

O diagnóstico de LCan é difícil e complexo, pelo facto de não existir uma apresentação clínica patognomónica e, porque nem todos os animais infectados desenvolvem sintomatologia. Outros factores limitantes ao diagnóstico serológico, incluem a existência de animais resistentes, que não produzem anticorpos, por não desenvolverem uma resposta humoral e, pelo facto que durante o período de seroconversão, não haver anticorpos em circulação.

Cada um dos métodos de diagnóstico utilizados, apresenta vantagens e desvantagens. Os métodos parasitológicos directos, são métodos que permitem a observação morfológica e rápida dos parasitas, mas no entanto apresentam uma baixa sensibilidade. Dos métodos imunoserológicos, a IFI é considerada a técnica *gold standard* devido à sua grande sensibilidade e especificidade (Rami, Atarhouch & Dakkak, 2005; Maia, 2005; Carvalho & Santos, 2006; Lage et al., 2007; Campino & Maia, 2008; Guerra et al., 2008). A técnica de ELISA, apresenta uma especificidade de 90,5% e uma sensibilidade de 100% e, está indicada para grande número de amostras (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Os métodos moleculares, permitem a detecção do ADN, independentemente de tratar-se de parasitas viáveis ou não (Maia, 2005). O RT-PCR é um método quantitativo muito útil no diagnóstico da LCan, que facilita a monitorização da carga parasitária antes e depois do tratamento. Na opinião da autora, o diagnóstico deve ser estabelecido com base na história clínica, quadro clínico e laboratorial, em conjunto com a visualização e identificação do parasita através de métodos parasitológicos e a realização de um método serológico associado a um método molecular (RT-PCR). No entanto, nem sempre é possível efectuar um plano de diagnóstico completo, já que por vezes é necessário efectuar um diagnóstico rápido para a instituição precoce de terapêutica eficaz. Por outro lado, o custo associado à realização de todas estas técnicas é elevado, e na maior parte das ocasiões apenas está disponível um dos métodos referidos.

Em relação à associação dos métodos de diagnóstico, verificamos que dois animais apresentavam resultados por cELISA com uma percentagem superior a 150%, mas no entanto apresentavam um PCR de zero valores. Apesar de o PCR ser um método pouco invasivo e aceitável pelos proprietários, a utilização de amostras biológicas (e.g. sangue), não são a melhor fonte para detectar o ADN de *Leishmania*, por não ser tão abundante como na pele e

nos gânglios linfáticos, corroborando com alguns dos resultados observados (Alvar et al., 2004; *Guest editorial*, 2008).

No que se refere à presença de doenças concomitantes presentes nos 12 animais, verificou-se que apenas um animal apresentava erliquiose, concordante com Pereira da Fonseca e Villa de Brito (2008). Estes autores relatam que, na leishmaniose, pode ocorrer uma imunossupressão e surgirem co-infecções, como a erliquiose, as riquetsioses, a hepatozoonose, a demodicose, a babesiose e menos frequente a neosporose. Relativamente as restantes doenças concomitantes neste estudo, a poliartrite e a insuficiência renal crónica estiveram directamente associadas à leishmaniose.

Relativamente à insuficiência hepática presente num cão com 9 anos de idade, não foi possível estabelecer uma ligação com a leishmaniose, pelo facto de apenas ter sido diagnosticado no mês de Fevereiro. Apresentava os níveis de ALT, de FA e de bilirrubina total extremamente elevados e, apresentava ecograficamente uma hepatomegália. Ficou hospitalizado, recebendo uma fluidoterapia com Lactato de Ringer, suplementado com 20 mEq de cloreto de potássio e medicado com ranitidina, Denosyl<sup>®</sup>, ácido ursodesoxicólico (Destolit<sup>®</sup>), Glucantime<sup>®</sup>, Zyloric<sup>®</sup> e foi alimentado com uma ração destinada a animais com alterações hepáticas. Durante a sua hospitalização teve uma síncope e continuava com vómitos. Devido a esta ocorrência da síncope, foi suspensa a medicação com Zyloric<sup>®</sup>. Segundo Alexandre-Pires e Correia (2008), as lesões que podem ser observadas no fígado são de hepatomegália congestiva, que mais tarde podem evoluir para uma hepatite crónica e, em alguns casos, cirrose.

Os dois animais com dermatite por *Malassezia* spp., apresentavam também uma dermatite queratoseborreica, com prurido, eritema e lesões nos pavilhões auriculares. Uma das lesões cutâneas mais característica da LCan, é uma dermatite queratoseborreica com áreas simétricas de alopecia e descamação seca difusa, não pruriginosa. No entanto, com a cronicidade das lesões, forma-se uma inflamação purulenta da pele, com eritema e dor (Rochette, 2003; Alexandre-Pires & Correia, 2008). Pensa-se assim, que o quadro dermatológico presente nestes dois animais, é do tipo crónico.

No que concerne à terapêutica, constatou-se que 79% (15/19) receberam uma terapêutica leishmanicida e leishmaniostática, com Glucantime<sup>®</sup> e Zyloric<sup>®</sup> respectivamente. A dose mais comumente utilizada de Glucantime foi de 75-100 mg/kg, SC, SID. Muitos autores afirmam que a dose recomendada deve ser de 100 mg/kg, SID (Corrales & Moreno, 2006; Baneth, 2006; Meireles, 2008). No entanto, Alvar et al. (2004) e Baneth e Shaw (2002) afirmam que a dose mais correcta é de 75 mg/kg BID. Em relação ao Zyloric<sup>®</sup>, foi utilizado na dose de 10 mg/kg, PO, BID, estando de acordo com a dose de 4 – 40 mg/kg referida por Santos-Gomes e

Pereira da Fonseca (2008). No entanto, vários autores mencionam que a dose mais utilizada é de 20 mg/kg, SID (Moreno et al., 1999; Baneth et al., 2005; Roze, 2005; Baneth, 2006; Meireles, 2008).

Em relação à duração da terapêutica, constatou-se que 84% (16 animais) da amostra receberam Glucantime<sup>®</sup> durante 30 dias. Alguns autores afirmam que deve ser administrado em 2 a 3 séries diárias, preferendo 20 a 30 dias consecutivos ou em dias alternados, com intervalo de 15 dias a um mês entre cada série (Moreno et al., 1999; Baneth & Shaw, 2002; Baneth et al., 2005; Meireles, 2008). A duração de administração de Zyloric<sup>®</sup>, variou consoante a monitorização clínica do animal, mas 10 animais (50%) receberam o fármaco por tempo indefinido, consolidando as afirmações de Moreno et al. (1999), Baneth et al., (2005) e Roze (2005).

Para além deste protocolo terapêutico, foram implementados outros protocolos, em que dois animais apenas foram tratados com Glucantime<sup>®</sup>, um com Marbocil<sup>®</sup> associado ao Zyloric<sup>®</sup> e um outro animal com Milteforan<sup>®</sup> associado ao Zyloric<sup>®</sup>. A dose de Milteforan utilizada foi de 2 mg/kg durante 28 dias, que está de acordo com a dose recomendada (2-3 mg/kg) (Corrales & Moreno, 2006). Meireles (2008) afirma que a administração de Milteforan<sup>®</sup> é mais vantajosa, por não ser eliminada pela via renal, podendo assim ser utilizado em cães que insuficiência renal, embora não tenha sido a razão pela qual foi utilizado neste caso. A terapêutica isolada com Glucantime<sup>®</sup> foi realizada a dois animais com o objectivo de monitorizar a evolução clínica, por apresentarem uma doença concomitante associada, um linfoma e uma insuficiência hepática.

Dos 15 animais submetidos a uma terapêutica com Glucantime<sup>®</sup> e Zyloric<sup>®</sup>, verificou-se uma melhoria clínica, com redução dos sintomas e das alterações laboratoriais em 11 animais, indicando ser uma terapêutica eficaz. Todos os animais submetidos a este protocolo terapêutico apresentavam sintomatologia ou alterações laboratoriais características da leishmaniose. Dos 15 animais, três animais necessitaram de prolongar a terapêutica com Glucantime<sup>®</sup>. O prolongamento variou entre cinco dias a duas semanas, devido à descontinuidade da terapêutica por parte dos proprietários e num caso, devido ao agravamento do quadro clínico em uma semana. Vários factores poderão ter contribuído para a resposta negativa ao tratamento etiológico de quatro animais, por exemplo, a presença de uma doença concomitante ou de uma doença não diagnosticada, uma resistência aos fármacos ou por má aplicação do protocolo terapêutico por parte dos proprietários. Um dos casos em que não houve resposta à terapêutica inicial, pensa-se dever-se a uma resistência ao Glucantime<sup>®</sup>. Posteriormente foi aplicado uma outra terapêutica com Milteforan<sup>®</sup> e Zyloric<sup>®</sup>, que levou à melhoria do estado clínico do animal.



Em relação ao único animal submetido a uma terapêutica com Milteforan<sup>®</sup> associado ao Zyloric<sup>®</sup>, constatou-se uma melhoria no quadro clínico, com redução da sintomatologia e dos parâmetros bioquímicos alterados. Relativamente ao único animal submetido a uma terapêutica com Marbocil<sup>®</sup> associado ao Zyloric<sup>®</sup>, verificou-se que um mês após a instituição da terapêutica, desenvolveu uma pneumonia, não responsiva à doxiciclina (Vibramicina<sup>®</sup>). Pelo facto de apresentar os parâmetros renais aumentados, um UPC de 2,7, uma hiperproteinémia e uma trombocitopénia, foi implementado uma terapêutica com Milteforan<sup>®</sup>. No entanto, apesar da sua grande vantagem em animais com insuficiências renais, desenvolveu uma diarreia associada à medicação. Por fim, devido ao insucesso terapêutico observado, optaram por aplicar uma terapêutica com Glucantime<sup>®</sup> e Zyloric<sup>®</sup>, com a monitorização mensal dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Uma semana após o início da terapêutica, apresentava-se muito melhor clinicamente.

A monitorização e o controlo da doença, são necessários tendo em conta possíveis recidivas num período de seis meses após o tratamento e pelo facto da terapêutica não eliminar os parasitas na totalidade, verificando-se normalmente apenas uma cura clínica. Assim, a monitorização deve ser realizada a cada seis meses, de modo a permitir a reavaliação do estado clínico, através de exames complementares e de métodos de diagnóstico. Cabe ao Médico Veterinário informar os proprietários dos custos prováveis do tratamento e de monitorização, do prognóstico da doença e das implicações da doença em termos de Saúde Pública. É necessário sensibilizar os proprietários para necessidade da prevenção contra os flebótomos, de modo a reduzir a incidência de animais infectados e para evitar a disseminação da doença por outros canídeos.

### **3.2. Conclusão**

A componente prática do estágio curricular, realizado na Clínica SPAD e no Hospital Clínic Veterinari durante cinco meses, permitiu a aquisição de novos conhecimentos fundamentais para o desenvolvimento da futura actividade clínica profissional. A realização do estágio curricular em dois sítios diferentes, permitiu a observação de duas realidades completamente distintas, no entanto com um objectivo em comum, o bem-estar animal. Apesar de no HCV a autora não ter tido a autonomia que teve na Clínica SPAD, o estágio curricular não deixou de superar as suas expectativas. Num lado deparou-se com situações de dificuldades sócio-económicas, com o abandono dos animais, e a adopção dos mesmos, e a importância e gestão de um canil. No outro lado, um Hospital de Referência onde foram observados casos, dos mais comuns aos mais raros e onde as dificuldades sócio-económicas não eram um problema. Do pouco contacto que a autora teve com os proprietários, incentivou-a e estimulou uma maior confiança para exercer o seu papel como Médica Veterinária.

A situação sócio-económica é actualmente um factor importante na prática da Medicina Veterinária, limitando a área de actividade do Médico Veterinário, sendo necessário seleccionar alguns dos exames complementares essenciais para obter um diagnóstico. A dirofilariose e a leishmaniose, são duas doenças, em que é fundamental recorrer a um conjunto de exames complementares para chegar a um diagnóstico, requerendo algum dispêndio por parte dos proprietários. A existência deste factor, leva a que o Médico Veterinário estabeleça uma necessidade de seleccionar os métodos de diagnóstico e de tratamento, que melhor se adaptam à situação.

Ao longo dos anos, a incidência de casos de dirofilariose e leishmaniose têm vindo a aumentar, não só pela existência de determinados factores de risco, que têm vindo a limitar o seu controlo, como também, pelo desenvolvimento de melhores métodos de diagnóstico. Entre muitos, as alterações climáticas, uma maior convivência entre canídeos e humanos, a movimentação populacional entre zonas não endémicas e endémicas, pode levar a uma maior exposição do homem e dos canídeos aos vectores e conseqüentemente, aumento do risco de transmissão de infecções. No caso da dirofilariose, pode-se concluir que as temperaturas médias no Funchal, são um dos factores mais importantes para o desenvolvimento dos vectores e disseminação da doença.

O facto de muitos dos proprietários, maioritariamente dos cães com dirofilariose, não terem conhecimento da doença e dos meios preventivos, faz com que a incidência dos casos aumente consideravelmente ao longo dos anos. Assim, por apresentarem um carácter zoonótico, é fulcral a sensibilização e a informação dos proprietários por parte do Médico Veterinário sobre os riscos acrescidos tanto para os animais como para os proprietários, e da necessidade de realizar uma prevenção e um tratamento rigoroso. É de salientar que o papel do proprietário é muito importante, para o controlo dos vectores, como na apresentação dos seus animais à consulta. Em conjunto, a utilização de melhores métodos de diagnóstico e de medidas terapêuticas, incitam a uma melhor prevenção.

De forma a reduzir a incidência da dirofilariose e da leishmaniose, a indústria farmacêutica deve continuar a investir na produção de novos fármacos e novos métodos profiláctico, bem como vacinas no caso da leishmaniose, capazes de induzir uma imunidade contra os agentes.

#### IV. BIBLIOGRAFIA

- Adamama-Moraitou, K. K., Rallis, T. S., Koytinas, A. F., Tontis, D., Plevraki, K., & Kritsepi, M. (2007). Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: A prospective study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76 (1), 53-57.
- Afonso, M. O., & Alves-Pires, C. (2008). Bioecologia dos vectores. In G. M. Santos-Gomes, & I. M. Fonseca, *Leishmaniose canina* (pp. 27-34). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações, S.A.
- Aguiar, P. H., Santos, S. O., Pinheiro, A., Bittencourt, D. V., Costa, R. L., Julião, F. d., et al. (2007). Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 8 (4), 283-294.
- Alexandre-Pires, G. M., & Correia, J. J. (2008). Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In G. Santos-Gomes, & I. P. Fonseca, *Leishmaniose canina* (pp. 53-68). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações S.A.
- Almeida, A. G., Gonçalves, Y., Novo, M., Sousa, C., Melim, M., & Grácio, J. S. (15 de Novembro de 2007). *Vector monitoring of Aedes aegypti in the Autonomous Region of Madeira, Portugal*. Acedido em 2009, de Eurosurveillance: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3311>
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). *Canine Leishmaniasis*. Acedido em Maio de 2009, disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B7CTH-4DN8Y3V-1&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=9b27e40042141c4e94483618b696d380](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B7CTH-4DN8Y3V-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=9b27e40042141c4e94483618b696d380)
- Alves, C. F., Amorin, I. F., Moura, E. P., Ribeiro, R. R., Alves, C. F., Michalick, M. S., et al. (2009). Expression on IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and TGF- $\beta$  in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 349-358.
- Andrade, R. A., Araújo, M. S., Reis, A. B., Gontijo, C. M., Vianna, L. R., Mayrink, W., et al. (2009). Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: Diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 79-86.
- Arther, R. G., Bowman, D. D., Slone, R. L., & Travis, L. E. (2005). Imidacloprid plus moxidectin topical solution for the prevention of the heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs. *Parasitology Research*, 97, S71-S80.
- Aste, G., Tommaso, M. D., Steiner, J. M., Williams, D. A., & Boari, A. (2005). Pancreatitis associated with N-Methyl-Glucantime therapy in a dog with leishmaniasis. *Veterinary Research Communications*, 29, 269-272.
- Atkins, C. (2005). Canine Heartworm Disease. In E. J. Stephen, & E. C. Feldman (Ed), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (Vol. 2, pp. 1118-136). Philadelphia: Elsevier Inc.

- Atkins, C. E. (24-27 de Outubro de 2003). *Complications of Heartworm infection*. Acedido em 2009, disponível em: 28th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?&CID=WSAVA2003&PID=pr06534&O=Generic>
- Baneth, G. (2006). Leishmaniasis. In C. E. Greene (Ed), *Infectious diseases of the dog and cat* (3rd ed., pp. 685-695). Philadelphia: Elsevier, Inc.
- Baneth, G., & Shaw, S. E. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* , 106, 315-324.
- Baneth, G., Day, M., Roura, X., & Shaw, S. (2005). Leishmaniosis. In S. E. Shaw, & M. J. Day, *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat* (pp. 89-99). London: Manson Publishing Ltd.
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* , 24 (7), 324-330.
- Barrouin-Melo, S. M., Larangeira, D. F., Filho, F. A., Trigo, J., Julião, F. S., Franke, C. R., et al. (2006). Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *The Veterinary Journal* , 171, 331-339.
- Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadoré, J. L., et al. (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal* , 162, 108-120.
- Calvert, C. A., & Thomason, J. (2008). Heartworm Disease. In L. P. Tilley, J. Francis W. K. Smith, M. A. Oyama, & M. M. Sleeper, *Manual of canine and feline cardiology* (4th ed., pp. 183-199). Saunders & Elsevier Inc.
- Cardoso, L., & Mendão, C. (2009). Inquérito sobre a leishmaniose canina em Portugal - resultados preliminares. *Veterinary Medicine* , 11 (62), 57-62.
- Cardoso, L., Schallig, H. D., Neto, F., Kroon, N., & Rodrigues, M. (2004). Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Tropica* , 91, 95-100.
- Carrilo, E., & Moreno, J. (2009). Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* , 128, 67-70.
- Carvalho, L. M., & Santos, C. A. (2006). Dermatoses parasitárias em animais de companhia. *Veterinária Técnica* , 9, 42-47.
- Casiraghi, M., Bazzochi, C., Mortarino, M., Ottina, E., & Genchi, C. (2006). A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Veterinary Parasitology* , 4, 368-372.
- Catorze, M. G. (2005). Leishmaniose e SIDA. *Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana* , 33 (6), 237-250.
- Corrales, G. M., & Moreno, R. M. (2006). *Leishmaniosis canina: Manejo clínico y situación actual en España*. Química Farmacéutica Bayer, S. A.

- Corrêa, A. P., Dossi, A. C., Vasconcelos, R. d., Munari, D. P., & Lima, V. M. (2007). Evaluation of transformation growth factor  $\beta$ 1, interleukin-10, and interferon- $\gamma$  in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Parasitology*, 143, 267-274.
- Cortes, S., Afonso, M. O., Alves-Pires, C., & Campino, L. (2007). Stray dogs and Leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 13 (9), 1431-1432.
- Costa, C. H. N., Vieira J. B. F. (2001). Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34 (2), 223-228.
- Cunningham, A. C. (2002). Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, 72, 132-141.
- Cunningham, C. P., Brown, J. M., Jacobson, G. A., Brandon, M. R., & Martinod, S. R. (2006). Evaluation of a covered-rod silicone implant containing ivermectine for long-term prevention of heartworm infection in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 9, 1564-1569.
- Dantas-Torres, F. (2006). Leishmune® vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Veterinary Parasitology*, 141, 1-8.
- Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149, 139-146.
- Datta, S., Maitra, S., Gayen, P., & Babu, S. P. (9 de Maio de 2009). *Improved efficacy of tetracycline by acaciasides on Dirofilaria immitis*. Obtido em Abril de 2009, de SpringerLink - Journal Article: <http://www.springerlink.com/content/70917661341437m1/>
- Day, M. J. (2007). Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. *Veterinary Parasitology*, 147, 2-8.
- Day, M., Mackin, A., & Littlewood, J. (2000). *Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. Hampshire: BSAVA.
- Dias, E. L., Batista, Z. d., Guerra, R. d., Calabrese, K. d., Lima, T. B., & Abreu-Silva, A. L. (2008). Canine visceral leishmaniasis (CVL): Seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão state, Brazil. *Ciência Animal Brasileira*, 9 (3), 740-745.
- Dujardin, J.-C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J.-P., Gradoni, L., Soteriadou, K., et al. (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (7), 1013-1018.
- Editorial, G. (2008). Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, 175, 14-15.
- Ferasin, L., & Knight, D. (2005). Filarial infections. In S. E. Shaw, & M. J. Day, *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat* (pp. 51-61). London: Manson Publishing Ltd.

- Ferroglio, E., Centaro, E., Mignone, W., & Trisciuglio, A. (2007). Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* in dog as compared with immunofluorescence assay. *Veterinary Parasitology*, 144, 162-166.
- Ferroglio, E., Poggi, M., & Trisciuglio, A. (2008). Evaluation of a 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Public Health*, 55 (3), 145-148.
- Fraile, C., Frisuelos, C., & Miró, G. (2001, Abril). Zoonosis sistémicas. *Canis et Felis*, 15, 72-85.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M., & Cringoli, G. (2005). Is heartworm disease really spreading in Europe? *Veterinary Parasitology*, 133, 137-148.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., & Cringoli, G. (2009). *Climate and Dirofilaria immitis infection in Europe*. Acedido em Maio 2009, disponível em: de [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)
- Georgi, J. R. (1980). *Parasitology for Veterinarians*. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Ginel, P. J., Camacho, S., & Lucena, R. (2008). Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. *Research in Veterinary Science*, 85, 510-514.
- Giunchetti, R. C., Reis, A. B., Silveira-Lemos, D. d., Martins-Filho, O. A., Corrêa-Oliveira, R., Bethony, J., et al. (2008). Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, 85, 106-112.
- Glickman, L. T., Glickman, N. W., Moore, G. E., Lock, J. B., McCall, J. W., & Lewis, H. B. (2006). Comparative effectiveness of sustained-release moxidectin (ProHeart 6) and ivermectin (Heartgard Plus) for prevention of heartworm infection in dogs in the United States. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 4, 339-354.
- Gomes, Y. M., Cavalcanti, M. P., Lira, R. A., Abath, F. G., & Alves, L. C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175, 45-52.
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J., Gascón, M., Zarate, J., Alvarez, F., & Couto, C. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *The Veterinary Journal*, 179, 259-263.
- Gonçalves, R., Tafuri, W. L., Melo, M. N., Raso, P., & Tafuri, W. L. (2003). Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: A histopathological and morphometric study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45 (3), 153-158.
- Gough, A. (2007). *Differential diagnosis in small animal medicine*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35, 1169-1180.
- Guarga, J. L., Lucientes, J., Peribáñez, M. A., Molina, R., Gracia, M. J., & Castillo, J. A. (2000). Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Tropica*, 77, 203-207.

- Hodges, S., & Rishniw, M. (2008). Intraarticular *Dirofilaria immitis* microfilariae. *Veterinary Parasitology*, 152, 167–170.
- Hodges, S., & Rishniw, M. (2008). Intraarticular *Dirofilaria immitis* microfilariae in two dogs. *Veterinary Parasitology*, 152, 167-170.
- Ikeda-Garcia, F. A., Lopes, R. S., Marques, F. J., Lima, V. M., Morinishi, C. K., Bonello, F. L., et al. (2007). Clinical and parasitology evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology*, 143, 254-259.
- Kitagawa, H., Koth, K., Ohba, Y., & Sasaki, Y. (24-27 de Outubro de 2003). *Heartworm Caval Syndrome: Pathophysiology*. Acedido em 2009, disponível em: 28th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?&CID=WSAVA2003&PID=pr06578&O=Generic>
- Kittleson, M. D., & Kienle, R. D. (1998). *Small animal cardiovascular Medicine*. St. Louis: Mosby Inc.
- Kozek, W. J. (2005). What is new in the Wolbachia/Dirofilaria interaction? *Veterinary Parasitology*, 133, 127-132.
- Kramer, L. H., Tamarozzi, F., Morchón, R., López-Belmonte, J., Marcos-Atxutegi, C., Martín-Pacho, R., et al. (2005). Immune response to and tissue localization of the Wolbachia surface protein (WSP) in dogs with natural heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106, 303-308.
- Labarthe, N., Serrão, M. L., Melo, Y. F., José, S., & Lourenço-de-Oliveira, R. (1998). Potential Vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, Oceanic Region of Niterói Municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93 (4), 425-432.
- Lage, R. S., Oliveira, G. C., Busek, S. U., Guerra, L. L., Giunchetti, R. C., Corrêa-Oliveira, R., et al. (2007). Analysis of the cytokine in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 115, 135-145.
- Liarte, D. B., Mendonça, I. L., Luz, F. C., Abreu, E. A., Mello, G. W., Farias, T. J., et al. (2001). QBC® for the diagnosis of human and canine american visceral leishmaniasis: preliminary data. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34 (6), 577-581.
- Lima-Netto, C. (2000). *Todo sobre la leishmaniasis canina* (1ª ed.). Barcelona: Susaeta Ediciones, S. A.
- Lok, J. B., Washabau, R. J., Heaney, K., Nolan, T. J., Hendrick, M. J., Neumann, N. R., et al. (2005). Six-month prophylactic efficacy of moxidectin sustained release (SR) injectable for dogs against experimental heartworm infection in growing puppies. *Veterinary Parasitology*, 133, 233-241.
- Maia, C. A. (2005). Diagnóstico laboratorial da leishmaniose canina. *Veterinária Técnica*, 34-37.
- Maia, C., & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274-287.

- Manna, L., Reale, F. V., Picillo, E., Neglia, G., Vescio, F., & Gravino, A. E. (2008). *Study of the efficacy of the miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis*. Acedido em 2009, disponível em: [www.elsevier.com/locate/tvj1](http://www.elsevier.com/locate/tvj1)
- Manzillo, V. F., Oliva, G., Pagano, A., Manna, L., Maroli, M., & Gradoni, L. (2006). Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary Parasitology*, 142, 142-145.
- Mar, P.-H., Yang, I.-c., Chang, G.-N., & Fei, A. C.-Y. (2002). Specific polymerase chain reaction of differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived. *Veterinary Parasitology*, 106, 243-252.
- Marques, N., Cabral, S., Sá, R., Coelho, F., Oliveira, J., Cunha, J. G., et al. (2007). Leishmaniose visceral e infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana na era da terapêutica anti-retrovírica de alta eficácia. *Acta Médica Portuguesa*, 291-298.
- McCall, J. W. (2005). The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: A review, an update, and recommendations. *Veterinary Parasitology*, 133, 197-206.
- McCall, J. W., Genchi, C., Kramer, L., Guerrero, J., Dzimiński, M. T., Supakorndej, P., et al. (2008). Heartworm and Wolbachia: Therapeutic implications. *Veterinary Parasitology*, 158, 204-214.
- McGrotty, Y., & Tennant, K. (2005). Disorders of plasma proteins. In E. Villiers, & L. Blackwood, *Canine and Feline clinical pathology* (2nd ed., pp. 99-104). Gloucester: BSAVA.
- Mealey, K. L. (2008). Canine ABCB1 and macrocyclic lactones: Heartworm prevention and pharmacogenetics. *Veterinary Parasitology*, 158, 215-22.
- Meireles, J. A. (2008). Terapêutica e Profilaxia da Leishmaniose canina. In G. Santos-Gomes, & I. P. Fonseca, *Leishmaniose canina* (pp. 93-103). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações S.A.
- Melo, F., Amaral, M., Oliveira, P., Lima, W., Andrade, M., Michalick, M., et al. (2008). Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79 (2), 198-204.
- Mendão, C. (2009). Leishmaniose assintomática em cães. *Veterinary Medicine*, 11 (62), 27-31.
- Miranda, S., Martorell, S., Costa, M., Ferrer, L., & Ramis, A. (2007). Characterization of circulating lymphocytes subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. *Veterinary Parasitology*, 144, 251-260.
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., & Ramis, A. (2008). Characterization of age, sex, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Veterinary Science*, 85, 35-38.
- Miró, G. (2008). Leishmaniose canina: Avanços no controlo da doença. *Videoconferência interactiva Ibérica* (pp. 9-12). Barcelona: Bayer HealthCare.



- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology* , 24 (8), 371-377.
- Morchón, R., Rodríguez-Barbero, A., Velasco, S., López-Belmonte, J., & Simón, F. (2008). Vascular endothelial cell activation by adult *Dirofilaria immitis* antigens. *Parasitology International* , 57, 441-446.
- Moreno, A. M., Nieto, C. G., & Hernández, S. (1999). Leishmaniosis canina. In M. C. Campillo, F. A. Vázquez, A. R. Fernández, C. S. Acedo, S. H. Rodríguez, I. N. López-Cozar, et al., *Parasitología Veterinaria* (pp. 652-665). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Moreno, J., & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trens in Parasitology* , 18 (9), 399-405.
- Nissen, Michael D. (2006). Dirofilariosis. Acedido em Julho de 2009, disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/236698-overview>
- Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., Pagés, E., Marcos-Atxutegi, C., & Simón, F. (2009). Identification of immunoreactive proteins from dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differential recognized by the sera from dogs with patent or occult infections. *Molecular & Biochemical Parasitology* , 166, 134-141.
- Oliveira, F., Jochim, R. C., Valenzuela, J. G., & Kamhawi, S. (2009). Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. *Parasitology International* , 58, 1-5.
- OMS. (2006). *Control of leishmaniasis*. Acedido em Julho de 2009, disponível em: [https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB118/B118\\_4-en.pdf](https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB118/B118_4-en.pdf)
- Otranto, D., Paradies, P., Lia, R. P., Latrofa, M. S., Testini, G., Cantacessi, C., et al. (2007). Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of the leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology* , 144, 270-278.
- Owens, J. M., & Biery, D. N. (1999). *RAdiographic interpretation for the small animal clinician* (2nd ed.). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Pereira da Fonseca, I. M., & Santos-Gomes, G. M. (2008). Perspectivas futuras. In G. Santos-Gomes, & I. P. Fonseca, *Leishmaniose canina* (pp. 105-111). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações S.A.
- Pereira da Fonseca, I. M., Carvalho, L. M., Carvalho, S. P., & Carvalho-Varela, M. (1991). Prevalência da Dirofilariose na população canina Portuguesa I. Detecção de Microfilárias Sanguíneas. *Veterinária Técnica* , 36-38.
- Pereira da Fonseca, I., & Villa de Brito, M. T. (2008). Diagnóstico. In G. M. Santos-Gomes, & I. M. Fonseca, *Leishmaniose canina* (83-91). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações S. A.
- Pereira, M. A. (2008). Epidemiologia da leishmaniose canina. In G. Santos-Gomes, & I. P. Fonseca, *Leishmaniose canina* (pp. 41-52). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações S.A.
- Rami, M., Atarhouch, T., & Dakkak, A. (2005). Identification of two highly performing *Leishmania infantum* antigens for serodiagnosis of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* , 134, 25-31.

- Ramsey, I. (2008). *Small Animal Formulary* (6th ed.). Wales: BSAVA.
- Rebar, A. H., MacWilliams, P. S., & Feldman, B. F. (18 de Julho de 2005). *International Veterinary Information Service*. Acedido em Maio de 2009, disponível em: <http://www.ivis.org/home.asp>
- Reis, A. B., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M. G., Mayrink, W., França-Silva, J. C., et al. (2006). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, 81, 68-75.
- Rochette, F. (2003). *Los parásitos del perro y su control*. Bélgica: Janssen Animal Health B.V.B.A.
- Rollinson, D., & Hay, S. I. (2008). *Advances in Parasitology* (Vol. 66). London: Elsevier Inc.
- Rougier, S., Vouldoukis, I., Fournel, S., Pèrés, S., & Woehrlé, F. (2008). Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: A pilot study. *Veterinary Parasitology*, 153, 244-254.
- Roze, M. (2005). Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. *European Journal of Companion Animal Practice*, 15 (1), 39-52.
- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Sanchez, A., & Francino, O. (2005). Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *Journal of Heredity*, 96, 755-758.
- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Utzet-Sadurni, M., Giger, U., Sanchez, A., & Francino, O. (2008). *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. Acedido em Maio de 2009, disponível em: <http://vetres.org>
- Santa-Ana, M., Khadem, M., & Capela, R. (2006). Natural infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) on Madeira Island, Portugal. *Journal of Medical Entomology*, 43 (1), 104-106.
- Santos, M., Marcos, R., Assunção, M., & Matos, A. J. (2006). Polyarthrititis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Veterinary Parasitology*, 141, 340-344.
- Santos-Gomes, G. M., Rodrigues, O. R., & Marques, C. (2008). Resposta imunológica. In G. Santos-Gomes, & I. P. Fonseca, *Leishmaniose canina* (pp. 69-82). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações S.A.
- Saridomichelakis, M. N., Mylonakis, M. E., Leontides, L. S., Billinis, C., Koutinas, A. F., Galatos, A. D., 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.
- Sastre, N., Francino, O., Ramírez, O., Enseñat, C., Sánchez, A., & Altet, L. (2008). Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Veterinary Parasitology*, 117-120.
- Silva, F. L., Oliveira, R. G., Silva, T. M., Xavier, M. N., Nascimento, E. F., & Santos, R. L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 55-59.

- Simón, D., Kramer, L., Román, A., Blasini, W., Morchón, R., Marcos-Atxutegi, C., et al. (2007). Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary Research Communications* , 31, 161-171.
- Simón, F., Morchón, R., Rodríguez-Barbero, A., López-Belmonte, J., Grandi, G., & Genchi, C. (2008). *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia*-derived antigens: Its effect on endothelial mammal cells. *Veterinary Parasitology* , 158, 223-231.
- Society, A. H. (2005). *Guidelines For the Diagnosis, Prevention and Management of Heartworm (Dirofilaria immitis) Infection in Dogs*. Acedido em 11 de Outubro de 2008, disponível em: American Heartworm Society: <http://heartwormsociety.org>
- Solano-Gallego, L., Lull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., et al. (2000). The Iberian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology* , 90, 37-45.
- Souza, A. I., Juliano, R. S., Gomes, T. S., Diniz, S. d., Borges, Á. M., Tafuri, W. L., et al. (2005). Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Veterinary Parasitology* , 129, 51-54.
- Tilley, L. P., Tilley, L. P., & Tilley. (1992). *Essentials of canine and feline electrocardiography interpretation and treatment* (3rd ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Tomás, A. M., & Romão, S. d. (2008). Biologia do Parasita. In G. M. Santos-Gomes, & I. M. Fonseca, *Leishmaniose canina* (p. 8). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações S. A.
- Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A. M., & Jennings, F. W. (1996). *Parasitologia Veterinária* (2ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, S.A.
- Valladares, J. E., Gopegui, R. R., Riera, C., Alberola, J., Gállego, M., Espada, Y., et al. (1998). Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Research in Veterinary Science* , 64, 195-198.
- Venco, L., McCall, J. W., Guerrero, J., & Genchi, C. (2004). Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of natural acquired heartworm infections in dogs. *Veterinary Parasitology* , 124, 259-268.
- Vezzani, D., Eiras, D. F., & Wisnivesky, C. (2006). Dirofilariasis in Argentina: Historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. *Veterinary Parasitology* , 136, 259-273.
- Vries, P. J. (2006). *GeoSpecies Knowledge Base*. Acedido em Julho, 2009, disponível em: [http://species.geospecies.org/specs/Culex\\_pipiens](http://species.geospecies.org/specs/Culex_pipiens)
- Wall, R., & Shearer, D. (2001). *Veterinary Ectoparasites* (2nd ed.). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Ware, W. A. (2007). *Cardiovascular disease in small animal medicine*. London: Manson Publishing Ltd.
- Watts, K. J., Courtney, C. H., & Reddy, G. R. (1999). *Development of a PCR- and probe-based test for the sensitive and specific detection of the Dog Heartworm, Dirofilaria immitis, in its mosquito intermediate host*. Acedido em 2009, disponível em: Ideal Library: <http://www.idealibrary.com>

Wilson, M. E., Jeronimo, S. M., & Pearson, R. D. (2005). Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis* , 38, 147-160.