

PATRÍCIA MARQUES MONTEIRO

**ALTERAÇÕES DE PROTEINOGRAMA EM
CANÍDEOS COM LEISHMANIOSE ANTES E APÓS
TRATAMENTO**

Orientadora: Professora Doutora Joana Tavares de Oliveira

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2014

PATRÍCIA MARQUES MONTEIRO

**ALTERAÇÕES DE PROTEINOGRAMA EM
CANÍDEOS COM LEISHMANIOSE ANTES E APÓS
TRATAMENTO**

Dissertação apresentada para a obtenção do
Grau de Mestre em Medicina Veterinária no
curso de Mestrado Integrado em Medicina
Veterinária conferido pela Universidade
Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Orientadora: Professora Doutora Joana Tavares
de Oliveira
Co-orientador: Professor Doutor Luís Miguel
Alves Carreira

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Doutor Miguel Carreira por todo o apoio, disponibilidade, orientação e transmissão de conhecimentos, essenciais para a elaboração deste trabalho e durante o período de estágio curricular.

Agradeço à Prof. Doutora Joana Oliveira por toda a simpatia, apoio e transmissão de conhecimentos essenciais para a elaboração deste trabalho.

Agradeço à Dra. Alexandra Costa, à Dra. Eva Mendes e ao Dr. Pedro Azevedo por todo o apoio, orientação, amizade e por todos os bons momentos passados durante o período de estágio curricular.

Agradeço à minha colega de estágio Filipa Mira, por todo o companheirismo, amizade e por todos os momentos bem passados durante o período de estágio curricular.

Agradeço ao meu pai por todo o apoio e amizade durante estes anos, por ser o responsável por poder concluir este sonho, por querer seguir este caminho e por ser um exemplo a seguir.

Agradeço a todos os meus avós, à minha mãe e aos meus irmãos por todo apoio, carinho e força e por terem acreditado em mim.

Agradeço à minha amiga e colega de curso Marta Lemos pela amizade, paciência e apoio ao longo desta jornada.

Agradeço aos meus colegas de curso Fábio Pontes, Kévin Rodrigues, Joana Teixeira, Catarina Machado, André Gonçalves, Ana Pereira e a todos os outros pela amizade e por todos os bons momentos passados durante estes anos.

Agradeço às minhas amigas Andreia Colaço, Inês Colaço, Marta Travessa, Inês Gaspar e ao meu amigo Marco Figueiredo por toda a amizade, paciência e força durante este período.

Agradeço ao Senhor António Fernandes por toda a força, amizade e apoio demonstrados para a conclusão desta etapa.

RESUMO

A quantificação da titulação de anticorpos para a monitorização da resposta à terapêutica em pacientes com Leishmaniose canina é controversa. Alguns estudos afirmam que a mesma não diminui nos primeiros meses após o tratamento, enquanto outros, mais recentes, afirmam que há uma diminuição lenta e progressiva durante a terapêutica. O proteinograma poderá ser utilizado em alternativa como meio de diagnóstico auxiliar mas também como monitorização terapêutica. O presente estudo foi realizado numa amostra de 14 indivíduos da espécie *Canis familiaris* (n=14) com Leishmaniose. O estudo teve como objetivo principal avaliar as alterações presentes no proteinograma e perceber a sua evolução em 3 momentos de estudo diferentes: diagnóstico (M0); 30 dias após início de terapêutica (M1) e 120 dias após início da terapêutica (M2). Para além do proteinograma, a titulação de anticorpos foi também avaliada em 2 momentos diferentes, M0 e M2. A maioria dos pacientes apresentou alterações ao nível das frações proteicas no momento do diagnóstico: hiperglobulinémia γ e β associada a uma hiperproteinémia, hipoalbuminémia e inversão da relação albumina/globulina (A/G). Observou-se ainda: uma diminuição estatisticamente significativa das frações α -2, β -, γ -globulinas e de proteínas totais (PTs); um aumento da relação A/G; e uma diminuição na percentagem de pacientes com alterações ao nível das frações proteicas em M2 revelando uma boa resposta à terapêutica. Relativamente à titulação de anticorpos, a maioria dos pacientes não apresentou uma diminuição significativa desta após terapêutica. Assim, a utilização isolada de testes serológicos não mostrou ser um método eficaz na monitorização terapêutica. Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que o proteinograma poderá ser um bom método de diagnóstico auxiliar e constituir um método eficaz na avaliação da eficácia terapêutica.

Palavras-chave: Leishmaniose, Monitorização terapêutica, Proteinograma, Canídeo

ABSTRACT

Quantification of antibody titration for monitoring response to therapy in patients with Canine Leishmaniasis is controversial. Some studies claim that it does not decrease in the first months after treatment, while others, more recent, claim that there is a slow and progressive decrease during therapy. The proteinogram can be used alternatively as a diagnostic aid but also as therapeutic efficacy monitoring. The present study was conducted on a sample of 14 individuals of the *Canis familiaris* species (n = 14) with Leishmaniasis. The study aimed to evaluate the proteinogram alterations and observe its differences in 3 different moments of study: diagnosis (M0); 30 days after start of therapy (M1), and 120 days after initiation of therapy (M2). In addition to the proteinogram, antibody titration was also evaluated in 2 different moments M0 and M2. Most patients had changes at the level of protein fractions at diagnosis: γ - and β -hyperglobulinemia associated with a hyperproteinemia, hypoalbuminaemia and an altered albumin / globulin ratio (A/G). It was also observed: a statistically significant decrease of the fractions α -2, β -, γ -globulin and total protein (PTs); an increase in A/G ratio; and a decrease in the percentage of patients with changes at the level of M2 protein fractions showing a good response to therapy. Regarding the antibody titration, most patients did not show its significant reduction after therapy. Thus, the single use of serological tests showed not to be an effective method for therapeutic monitoring. The results obtained in this study showed that the proteinogram might be a good method to assist the diagnosis and provide an effective method in the evaluation of treatment efficacy.

Key-words: Leishmaniasis, Proteinogram, Therapeutic monitoring, Dog

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius
% - Percentagem
α-globulina – Alfa globulina
β-globulina – Beta globulina
γ-globulina – Gama globulina
A/G – relação albumina globulinas
BID – A cada 12 horas
CD4+ - Células T - helper
CD8+ - Células T citotóxicas
DDT – *Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane*
ADN – Ácido Desoxirribonucleico
ARN – Ácido Ribonucleico
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*
EV – Via endovenosa
FML – Ligando fructose-manose
g – Grama
IFI – Imunofluorescência Indirecta
IFN-γ – Interferão gama
IgA – Imunoglobulina A
IgE – Imunoglobulina E
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL – Interleucina
IM - Via Intramuscular
IRC – Insuficiência Renal Crónica
Kg – quilograma
mg – miligrama
MO – medula óssea
NK – Células Natural Killer
NO - Óxido Nítrico
PCR –polymerase chain reaction
PFA – Proteína de Fase Aguda
PTs – proteínas totais
PD – Polidipsia

PU - Poliúria

Th – T helpers

Sb3+ – Antimoniais Trivalentes

Sb5+ – Antimoniais Pentavalentes

SC – via subcutânea

SID – A cada 24 horas

SNC- Sistema Nervoso Central

TFC – Taxa Fracional Metabólica

Th1 – Resposta imune T-helper tipo 1

Th2 – Resposta imune T-helper tipo 2

TNF- α – Factor de Necrose Tumoral alfa

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	0
RESUMO	4
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	6
ÍNDICE DE TABELAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1. Etiologia	12
2. Epidemiologia.....	15
3. Patogenia.....	15
3.1. Patogenicidade Parasita	16
3.2 - Hospedeiro	16
3.2.1- Resposta Imunitária.....	16
3.2.2 - Suscetibilidade	18
4 – Quadro Clínico	18
4.1- Sintomatologia	18
4.2 – Quadro laboratorial.....	20
5- Diagnóstico	21
5.1- Testes Serológicos.....	21
5.1.1- Imunofluorescência Indireta.....	22
5.1.2 – Testes rápidos imunocromatográficos.....	23
5.2 - PCR (Reação Polimerase em Cadeia)	23
5.3 – Microscopia e Cultura.....	24
5.4 – Outros Testes.....	24
6 - Terapêutica.....	24
6.1- Antimoniais Pentavalentes	25
6.2 – Análogos das Purinas.....	26
6.3 – Associação dos antimoniais pentavalentes com alopurinol.....	26
6.4 - Miltefosina.....	27
6.5 – Anfotericina B.....	27
6.6 –Pentamina	28

6.7 – Aminosidina.....	28
7- Controlo e prevenção.....	29
8- Leishmaniose e Saúde Pública	30
9- Marcadores laboratoriais	31
10- Proteínas de Fase Aguda.....	32
11- Eletroforese de Proteínas Séricas	33
11.1. Albumina	36
11.2 Fração alfa	36
11.3. Fração beta	37
11.4. Fração gama	39
12 – Variações Fisiológicas	40
13- Relação albumina/globulina (A/G)	40
14-Eletroforese de Proteínas Séricas na Leishmaniose Canina	43
II - ESTUDO DAS PRINCIPAIS ALTERAÇÕES NO PROTEINOGRAMA DE CANÍDEOS COM LEISHMANIOSE ANTES E APÓS TRATAMENTO.....	46
1 - Objetivos	46
2 – Material e métodos	46
3 - Resultados	48
4 - Discussão.....	60
5 - Conclusão	67
Bibliografia	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais Proteínas de Fase Aguda reportadas nos animais domésticos (Adaptado de Thomas, 2000).....	32
Tabela 2. Principais proteínas constituintes das fracções α , β e γ	39
Tabela 3. Valores médios de proteínas séricas de 14 pacientes portadores de leishmaniose no momento do diagnóstico (M0).	51
Tabela 4. Valores médios das proteínas séricas de 14 pacientes com leishmaniose em M1.	52

Tabela 5. Valores médios das concentrações de proteínas séricas de 14 pacientes com leishmaniose em M2.	53
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: A - Cultura contendo a forma promastigota da <i>Leishmania infantum</i> (Adaptado de Greene, 2006). B - Presença de um grande número de formas amastigotas no interior e no exterior de macrófagos, proveniente de uma citologia de medula óssea (Solano- Gallego <i>et al</i> , 2011).	12
Figura 2: Modos alternativos de transmissão da doença. (Adaptado de Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2011).....	13
Figura 3: Ciclo de vida da espécie <i>Leishmania infantum</i> , responsável pela Leishmaniose canina. (Adaptado de Greene, 2006).	14
Figura 4: A - Dermatite esfoliativa com descamação da face e extremidades das orelhas (Adaptado de Greene, 2006). B - Blefarite e conjuntivite purulenta (Adaptado de Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2011).	19
Figura 5: - Eletroforese proteínas séricas em gel de agarose, demonstrando as várias frações proteicas em forma de bandas com coloração variável de diferentes espécies animais saudáveis. a – ovelha; b- vaca; c – porco; d- cão; e- gato; f- cavalo (Adaptado de Eckersall, 2008).	34
Figura 6- Migração das diferentes frações proteicas em meio alcalino (Adaptado de Keren, 2003).....	35
Figura 7- Traçado eletroforético de um cão saudável realizado em gel de agarose (Adaptado de Eckersall, 2008).....	35
Figura 8: Traçado eletroforético de um animal com leishmaniose onde é possível observar uma gamapatia policlonal da região β e γ (Fotografia original).....	43
Figura 9: Traçado eletroforético característico de um cão com mieloma múltiplo (linha vermelha) em comparação com um traçado eletroforético normal (linha tracejada). Nesta imagem é possível verificar a existência de um pico monoclonal da região γ . (Adaptado de Thomas, 2000)	43
Figura 10: Perfil eletroforético característico de um cão com Leishmaniose Canina (linha vermelha) em comparação com um perfil eletroforético de um cão saudável (linhas azuis). (Adaptado de Noli, 1999)	45
Figura 11- Frequência relativa do gênero dos pacientes pertencentes à amostra.....	48
Figura 12- Distribuição de pacientes por classes de idade.....	48

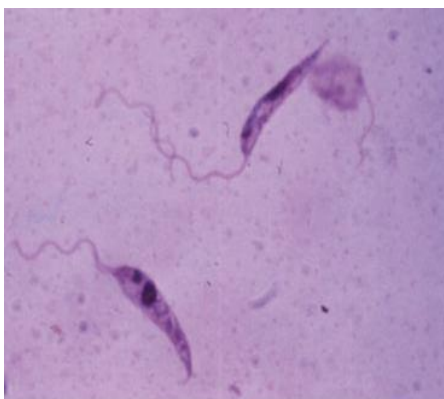
Figura 13: Frequência relativa das raças dos pacientes presentes na amostra.	49
Figura 14- Frequência absoluta e relativa dos sinais clínicos presentes nos pacientes pertencentes à amostra.	49
Figura 15- Frequência absoluta e relativa da titulação de anticorpos dos pacientes em M0.	50
Figura 16- Frequência absoluta e relativa da titulação de anticorpos dos pacientes em M2.	50
Figura 17- Frequência relativa e absoluta dos pacientes que aumentaram, diminuiram ou mantiveram a mesma titulação de anticorpos em M2 comparativamente a M0.....	51
Figura 18: A - Percentagem de pacientes com hiperproteinémia nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2). B - Percentagem de pacientes que apresentaram uma relação A/G diminuída nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2) C - Percentagem de pacientes com hipoalbuminémia nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2) D - Percentagem de pacientes com hiperglobulinémia- γ nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).	55
Figura 19: Valor médio do nível sérico das Proteínas Totais nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).	55
Figura 20: Valor médio da relação A/G nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2)....	56
Figura 21- Valor médio das concentrações séricas de albumina nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).....	57
Figura 22: Valor médio das concentrações séricas das frações α 1-globulina e α 2-globulina nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).....	57
Figura 23-: Valor médio da concentrações sérica da fração β -globulina nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).....	58
Figura 24: Valor médio das concentrações séricas da fração γ -globulina nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).	58

I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Etiologia

A Leishmaniose Canina é uma doença vetorial parasitária, causada por um protozoário pertencente ao género *Leishmania*, sendo transmitida pela picada de um pequeno inseto vetor denominado Díptero flebótomo (Bañuls *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009). A distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* divide-se em pertencentes ao “Velho Mundo” que inclui a Europa, África e Ásia e pertencentes ao “Novo Mundo” que inclui a América (Banuls *et al.*, 2007) A *Leishmania infantum* é o principal agente etiológico responsável pela Leishmaniose Canina nos países do “Velho Mundo”, sendo por isso nestes a espécie de maior importância em Medicina Veterinária, considerando-se equivalente a *Leishmania chagasi* nos países do “Novo Mundo” (Greene, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Para completar o seu ciclo de vida a *Leishmania* necessita de 2 hospedeiros, um hospedeiro intermediário invertebrado representado pelo flebótomo onde está presente a forma promastigota, extracelular e flagelada (Figura 1A); e um hospedeiro definitivo vertebrado que é representado pelo homem e o cão onde é encontrada a forma amastigota, intracelular e não flagelada (Figura 1B) (Noli, 1999; Greene, 2006, Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A



B

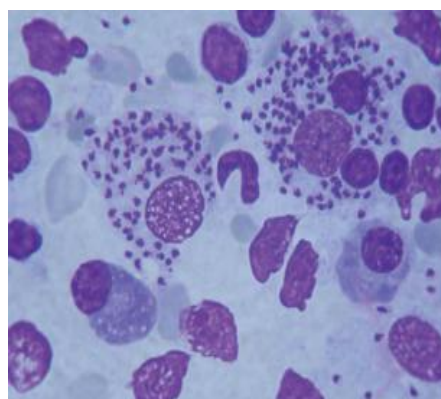


Figura 1. **A** - Cultura contendo a forma promastigota da *Leishmania infantum* (Adaptado de Greene, 2006). **B** - Presença de um grande número de formas amastigotas no interior e no exterior de macrófagos, proveniente de uma citologia de medula óssea (Solano- Gallego *et al.*, 2011).

Embora possa afetar outros vertebrados como por exemplo os felinos e os roedores, os cães domésticos (*Canis familiaris*) devido à sua proximidade com o humano, apresentam as características necessárias para serem reservatórios eficientes da *L. infantum*. Apresentam ainda um intenso parasitismo cutâneo e uma elevada

prevalência da doença, sendo por isso considerados os reservatórios principais da mesma (Dantas-Torres, 2007). O flebotomo apresenta dimensões muito reduzidas (aproximadamente 2 a 3 mm de comprimento), corpo coberto de pêlos e um voo silencioso estando o seu pico de atividade relacionado com a presença de temperaturas elevadas (entre 15° a 28° C) associado a altos níveis de humidade e ausência de vento ou chuva. A sua atividade é preferencialmente noturna e crepuscular desde o início da Primavera até ao fim do Outono nos países do Mediterrâneo, e durante todo o ano nos países da América do Sul (Sharma & Singh, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

O aparecimento de casos de Leishmaniose Canina em áreas não-endémicas ou em locais em que os insetos vetores se encontram ausentes sugere modos alternativos de transmissão da doença incluindo a transmissão vertical (transplacentária), horizontal (transfusões de sangue e venérea) (Figura 2) e a existência de vetores alternativos, nomeadamente a carraça *Rhipicephalus sanguineus* e a pulga *Ctenocephalides felis felis* (Coutinho *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2006; Naucke & Lorentz, 2012).

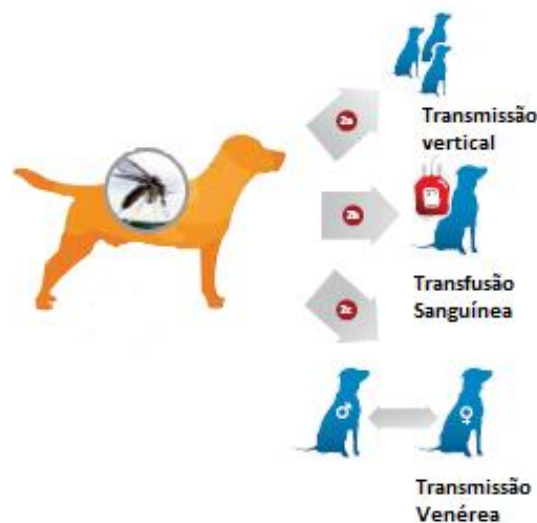


Figura 2. Modos alternativos de transmissão da doença. (Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011).

O ciclo de vida da *Leishmania* spp. (Figura 3) inicia-se quando a fêmea do género *Phlebotomus* se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado infetado, ingerindo as formas amastigotas do parasita, as quais se encontram no interior dos macrófagos (Noli, 1999). Já no hospedeiro intermediário, estas dirigem-se para o intestino médio do inseto, onde sofrem digestão e se libertam dos macrófagos, iniciando uma série de alterações morfológicas onde se transformam em promastigotas com capacidade infetante e de onde migram depois para o hipostoma do vetor (Killick-Kendrick, 2002;

Nieves & Rondon, 2007). Ao puncionar o hospedeiro definitivo as formas promastigotas são inoculadas juntamente com a saliva, na pele do mesmo comportando-se como corpos estranhos e aderindo-se à superfície dos macrófagos e outras células dendríticas, onde vão sofrer um processo de fagocitose, alojando-se dentro de vacúolos parasitóforos (fagolisossomas), os quais os separam dos mecanismos de defesa da célula hospedeira (Greene, 2006; Ministério da Saúde [MS], 2007). No interior dos fagolisossomas, os promastigotas transformam-se em amastigotas, onde se multiplicam rapidamente por fissão binária de modo a destruírem a célula hospedeira, conseguindo-se libertar e infectar novas células, propagando a infeção. As células fagocitárias infectadas provenientes da pele, migram em direção à circulação sanguínea e linfática, atingindo os órgãos internos (MS, 2007).

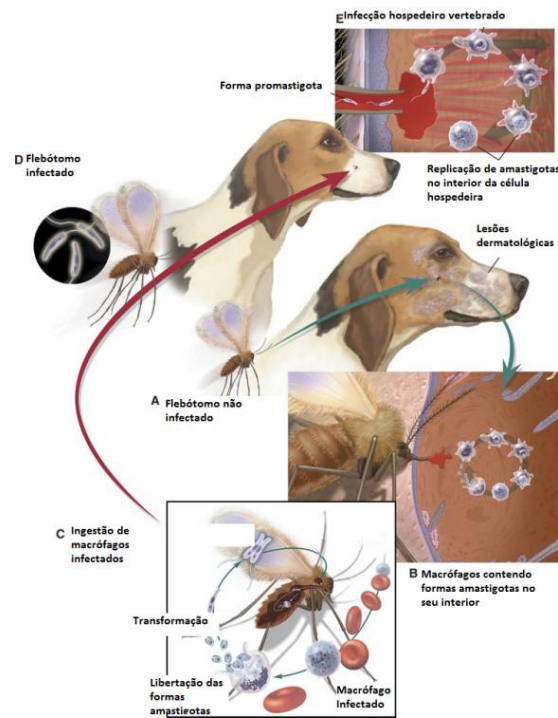


Figura 3. Ciclo de vida da espécie *Leishmania infantum*, responsável pela Leishmaniose Canina. (Adaptado de Greene, 2006).

2. Epidemiologia

Com exceção da Antártica, a Leishmaniose tem vindo a ser diagnosticada em todo o mundo (Greene, 2006). A espécie *Leishmania infantum* é endémica em aproximadamente 50 países, entre os quais Portugal, apresentando variadas taxas de prevalência, que estão na dependência das diferentes condições climatéricas e ecológicas, as quais influenciam a abundância dos artrópodes vetores da doença (Noli, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Nas regiões endémicas a prevalência da doença em cães é normalmente inferior a 10%, já que a maioria dos cães infectados não desenvolve uma sintomatologia exuberante, atuando principalmente como hospedeiros reservatórios do parasita (Solano-Gallego *et al.*, 2009). O aumento da incidência da doença, nos últimos anos, poderá estar diretamente relacionado com as alterações climáticas experimentadas, as quais se associam a uma maior atividade do vetor e conseqüentemente a uma maior transmissão ao homem e animais (Campino & Maia, 2010). Em Portugal, de acordo com o Observatório Nacional das Leishmanioses (criado devido à inexistência de um plano nacional de diagnóstico e controlo e com base em estudos de seroprevalência realizados), a região de Trás-os-Montes e Alto Douro, o concelho da Lousã, a sub-região da Cova da Beira, a região de Lisboa, o distrito de Setúbal, o concelho de Évora e o Algarve são consideradas zonas endémicas. São no entanto detetados em todo o território português casos de infeção, embora esporádicos (ONLeish).

3. Patogenia

A patogenia da Leishmaniose é bastante influenciada pela relação existente entre o hospedeiro e o parasita, onde uma série de fatores inerentes aos mesmos irá influenciar o tipo a resposta imunitária que é desencadeada, podendo ocorrer uma variedade de manifestações clínicas e imunológicas, que vai desde a ausência de doença clínica até à presença de quadros clínicos graves (Campillo *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

3.1. Patogenicidade Parasita

Em relação ao parasita, a patogenicidade de determinadas espécies de *Leishmania*, assim como os zimodemes correspondentes, irão determinar diferentes tipos de resposta imune por parte do hospedeiro, uma vez que os últimos podem ter diferentes virulências e antigenicidades (Campillo *et al*, 1999).

3.2 . Hospedeiro

3.2.1. Resposta Imunitária

A resposta imunitária desenvolvida pelo cão no momento da infeção e após a mesma, parece ser o fator mais importante na determinação do tipo de desenvolvimento e progressão da doença (Greene, 2006). Os doentes podem-se classificar em: 1) infetados clinicamente resistentes, quando não demonstram quadro clínico; ou 2) clinicamente suscetíveis, quando este está presente (Greene, 2006).

A resposta imunitária inata ou inespecífica (que constitui a primeira linha de defesa) inicia-se com a inoculação de promastigotas na pele do hospedeiro (Greene, 2006). Gera-se assim uma resposta inflamatória inicial onde predominam inicialmente os neutrófilos e os eosinófilos, seguidos dos macrófagos 2 a 3 dias mais tarde (Aga *et al.*, 2002; Ferrer, 2002). As células assassinas naturais ou *Natural Killer* (NK) aparentam ser as principais responsáveis pela manutenção da infeção na pele através da produção de Interferão-gama (INF- γ), o qual é um potente indutor da síntese de óxido nítrico (NO) ao nível dos macrófagos, sendo responsável pela eliminação intracelular do parasita após ativação por antígenios do mesmo e pela Interleucina-12 (IL12) (Ferrer, 2002). A apresentação dos antígenios aos linfócitos T auxiliares CD4+ ou *T-helper* (Th), por parte das células apresentadoras de antígenios, vai desencadear uma resposta imune adaptativa com a ativação e desenvolvimento de duas subpopulações de linfócitos T- auxiliares CD4+ (Greene, 2006).

A resistência à infeção está, pois, associada a uma resposta imunitária celular muito ativa, apresentando então os doentes resistentes uma resposta de hipersensibilidade do tipo IV ou tardia, baseada na produção de uma forte resposta de linfócitos do tipo T- auxiliares 1, (Th-1). Esta envolve a produção de citocinas como INF- γ , factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL- 2 e IL -12, as quais induzem a ativação dos macrófagos para posterior eliminação intracelular do parasita (Barbiéri, 2006). O papel

da IL-12 é crucial no controlo da infeção uma vez que induz a produção de INF- γ por parte das células polimorfonucleares e uma maior atividade das células NK, mantendo deste modo uma resposta imunitária eficaz dos linfócitos Th-1 (Ferrer, 2002; Barbiéri, 2006).

A suscetibilidade à infeção, está por sua vez relacionada com uma resposta imunitária do linfocítica *T-helper* tipo 2 (Th2) ou resposta imunitária humoral, a qual envolve a produção de IL-4, IL5, IL-6 e IL-10, que inibem a ativação macrofágica e a linfoproliferação, promovendo conseqüentemente a proliferação dos linfócitos B e a produção de anticorpos, os quais não apresentam uma função protetora, mas sim uma ação prejudicial para o organismo devido à formação de imunocomplexos e a sua conseqüente deposição na base das membranas das células, tecidos e órgãos (Campillo *et al.*, 1999; Noli, 1999; Selvapandiyar *et al.*, 2012).

Contudo, a evidência dos 2 tipos de resposta, Th1 e Th2, tem sido descrita em doentes assintomáticos nos quais houve a produção de IL-2, INF- γ e IL-10, ocorrendo, portanto uma predominância de IL-2 e INF- γ , não se podendo atribuir à IL-10 a responsabilidade pelo desenvolvimento de uma infeção sintomática (Barbiéri, 2006). A existência de uma dicotomia entre os diferentes tipos de linfócitos (Th1/Th2) nos doentes (cão e homem) não é ainda clara (Greene, 2006). Alguns estudos realizados demonstraram o envolvimento dos linfócitos CD8+ citotóxicos na resistência à infeção por Leishmaniose Canina, sugerindo a sua participação na lise dos macrófagos infetados apresentando-se pois como um mecanismo adicional à resistência à doença (Barbiéri, 2006).

O quadro clínico em indivíduos suscetíveis à infeção, pode desenvolver-se ao longo de um período que pode ir desde os 3 meses até aos 7 anos após infeção. No ponto de inoculação das formas promastigotas na pele do hospedeiro vertebrado forma-se uma lesão cutânea característica, ocorrendo a disseminação do parasita no interior dos macrófagos via linfática ou hemática (Campillo *et al.*, 1999). À medida que ocorre o desenvolvimento da doença, ocorre disseminação geral do parasita com uma colonização mais frequente em órgãos como os gânglios linfáticos, baço, medula óssea, fígado, rins e pele, conduzindo ao desenvolvimento de uma reação granulomatosa, onde um número variável de formas amastigotas pode ser detetado (Ferrer, 2002). Contudo, também se podem encontrar lesões nos testículos, próstata, bexiga, pulmão, intestino, globos oculares, Sistema Nervoso Central (SNC), articulações e ossos (Campillo *et al.*, 1999). Uma resposta humoral exagerada favorece os mecanismos imunopatogénicos, devido à produção massiva de imunoglobulinas resultado da estimulação policlonal de linfócitos B, constituindo um potencial dano para o hospedeiro devido à formação de imunocomplexos que se

podem depositar na parede dos vasos sanguíneos originando vasculites, poliartrites, uveítes e glomerulonefrites (Ferrer, 2002).

3.2.2. Suscetibilidade

Não se sabe até que ponto fatores como a idade, o sexo, o estado nutricional, a genética, a presença de doenças concomitantes, condições de imunossupressão, entre outros fatores, podem determinar as manifestações clínicas da infecção (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Estudos realizados recentemente demonstram que a suscetibilidade à infecção está associada a um gene designado de N-RAMPI (*natural resistance associated macrophage protein 1*), e que raças suscetíveis como o Boxer, Cocker Spaniel, Pastor Alemão e Rotweiller apresentam mutações ao nível do mesmo (Barbiéri, 2006; Greene, 2006). Já o Podengo de Ibiza é uma raça considerada resistente, pois vivem em zonas endêmicas e raramente manifesta sintomatologia (Barbiéri, 2006). Um estudo realizado na Universidade de Barcelona, realizado por Miranda *et al.* demonstrou uma prevalência da doença em animais entre os 2 e os 4 anos e com idade superior a 7 anos, o que poderá estar relacionar-se com o longo período de incubação do parasita (Miranda *et al.*, 2008; The Center for Food Security and Public Health [CFSPH], 2009).

4. Quadro Clínico

4.1. Sintomatologia

A apresentação clínica da Leishmaniose Canina é diferente em função dos: 1) mecanismos patogénicos ocorridos durante a evolução da doença; 2) dos diferentes órgãos afetados; 3) da diversidade das respostas imunitárias desenvolvidas pelo hospedeiro definitivo (Solano-Gallego *et al.*, 2009). As manifestações clínicas mais frequentemente encontradas ao exame físico são: a presença de lesões de pele; linfadenomegália generalizada; perda de peso progressiva; atrofia muscular; diminuição do apetite; letargia; esplenomegália; lesões oculares e onicogrifose sendo que a perda de peso progressiva e a atrofia muscular são os sinais clínicos mais comuns da presença de envolvimento visceral (Greene, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009)

As **lesões dermatológicas** constituem a manifestação clínica mais comum em doentes sintomáticos, apresentando uma prevalência de 56 - 90% e podendo ocorrer isoladamente ou em conjunto com outros sinais clínicos (Greene, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Em geral, variam em caráter e extensão, e raramente são pruríticas (Greene, 2006). A maioria dos animais desenvolve uma alopecia progressiva e simétrica, localizada sobretudo na face ao nível da região periocular e perilabial, difundido-se pela restante superfície corporal (Noli, 1999). Das afeções analisadas fazem parte a dermatite esfoliativa (Figura 4A) (associada a descamação na face, orelhas e membros), a dermatite ulcerativa (sobre proeminências ósseas, junções mucocutâneas, membros, cavidade nasal e pavilhão auditivo, entre outras), despigmentações, paniculites, hiperqueratoses nasais/digitais e erupções pustulares, entre outras (Solano-Gallego *et al.*, 2009). No que respeita às **lesões oculares e perioculares** (apesar de menos frequentes), estas constituem uma manifestação clínica isolada da doença em mais de 15% dos casos clínicos, sendo mais comuns as conjuntivites (Figura 4B), queratoconjuntivites secas (devido à destruição do aparelho lacrimal por parte das formas amastigostas do parasita), blefarites, dermatites perioculares e uveítes linfoplasmocitárias ou granulomatosas (Noli, 1999; Greene, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

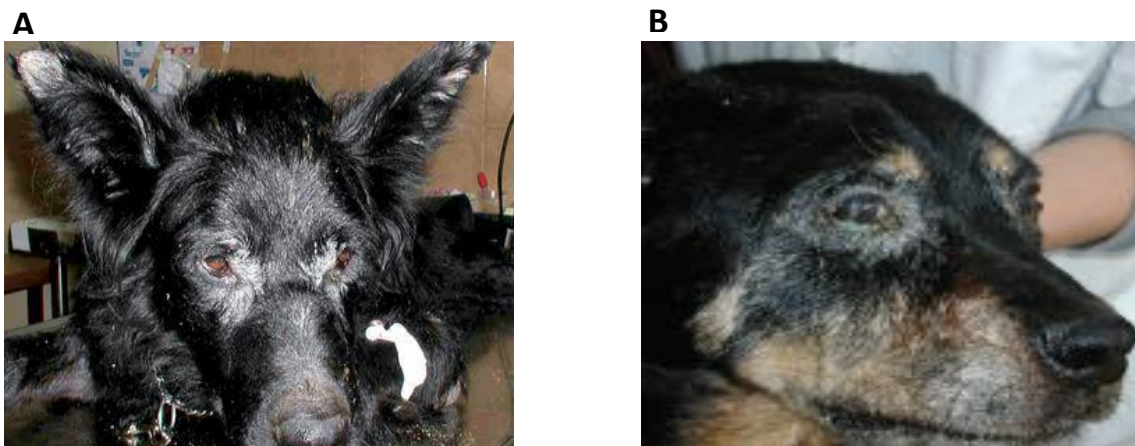


Figura 4. A - Dermatite esfoliativa com descamação da face e extremidades das orelhas (Adaptado de Greene, 2006).
B - Blefarite e conjuntivite purulenta (Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A **nível renal** a deposição de imunocomplexos ao nível da membrana basal do glomérulo, vai originar uma glomerulonefrite membronoproliferativa e/ou mesangioproliferativa. O diagnóstico precoce de doença renal é fundamental, uma vez que esta pode ser a única manifestação clínica da doença, podendo progredir desde uma simples proteinúria até uma síndrome nefrótica ou ao estadio final da doença renal. Nestes casos, a Insuficiência Renal Crónica (IRC) é uma manifestação da

progressão da doença, surgindo como a principal causa de morte em doentes com Leishmaniose (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A presença de **linfoadenomegália** (generalizada ou localizada), é também uma manifestação clínica muito comum aparecendo já numa fase inicial da doença (Noli, 1999; Vulpiani, 2011). Sinais como poliartites imunomediadas e a presença de epistaxis são outros exemplos da expressão clínica da doença (Noli, 1999; Vulpiani, 2011). Diatéses hemorrágicas podem ser observadas e estão relacionadas com a presença de uma hiperglobulinémia, (a qual interfere com a polimerização da fibrina), com um sequestro esplénico de plaquetas, com uma trombocitopenia por hipoplasia ou aplasia medular e com uma vasculite provocada pela deposição de imunocomplexos (Silva, 2007). Mais raramente pode ainda observar-se a presença de miocardite multifocal, hepatite crónica proliferativa, diarreia crónica, melena, e a presença de doença neurológica (devido à lesão da barreira hematoencefálica provocada pelo parasita) (Noli, 1999; Marcondes *et al.*, 2006; Silva, 2007). Também não é raro que um doente com Leishmaniose possa apresentar outras doenças parasitárias, nomeadamente, *Ehrlichia*, *Babesia*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma*, e *Dirofilaria*, principalmente em locais onde estes parasitas são endémicos (Greene, 2006).

4.2. Quadro laboratorial

Em termos laboratoriais os achados mais frequentes são hiperproteinémia associada a hiperglobulinémia e hipoalbuminémia e um ligeiro aumento das transaminases hepáticas. Um aumento pronunciado destas enzimas é indicativo de lesão hepática grave indicando que possivelmente o indivíduo já se encontra num estadio final da doença (Campillo *et al.*, 1999; Greene, 2006). A presença de anemia, é também um achado bastante frequente, podendo estar relacionada com a presença de hemorragias ativas à qual se adiciona uma diminuição da eritropoiese resultado da aplasia da medula óssea, ou devido à presença de IRC. A anemia não regenerativa (normocítica e normocrómica) é a mais comum, contudo uma anemia regenerativa hemolítica devido aos mecanismos imunomediados também pode ser observada (Soares *et al.*, 2005; Greene, 2006). O desenvolvimento de uma trombocitopenia devido à deposição de imunocomplexos, autoanticorpos e supressão da medula óssea, pode ser também observado (Greene, 2006) As lesões a nível renal, mais propriamente no glomérulo, causadas pela deposição de imunocomplexos, aumentam a permeabilidade dos capilares glomerulares à passagem de proteínas plasmáticas, mais especificamente da albumina, resultando em proteinúria, (relação

proteína/creatinina urinária > 0.5) (Soares *et al.*, 2005). Apesar das lesões a nível renal serem frequentes, a presença de azotemia renal é quase sempre um achado laboratorial invulgar e normalmente apenas evidente quando a maioria dos nefrónios já se encontram disfuncionais (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A presença de outras alterações hematológicas como a leucocitose, leucopenia e linfopenia também são comuns, assim como alterações ao nível do perfil lipídico sérico, apresentando-se pelo aumento do colesterol sérico total, associado a um aumento dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e uma diminuição dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Durgut, 2012). Tal condição poderá estar relacionada com o facto do colesterol ser essencial à manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado, uma vez que possibilita a entrada do parasita no interior dos macrófagos através de uma série de ligações à superfície celular (Ottoni, 2010).

5. Diagnóstico

O diagnóstico da Leishmaniose Canina é complexo já que os sinais clínicos e laboratoriais são variáveis e inespecíficos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Embora os indivíduos infetados apresentem um quadro clínico e laboratorial sugestivo de infeção, um diagnóstico preciso envolve a utilização de técnicas de diagnóstico específicas serológicas, moleculares, de microscopia e de cultura (Campillo *et al.*, 1999; Gradoni, 2002).

5.1. Testes Serológicos

Os testes serológicos consistem na deteção (qualitativa e quantitativa) de anticorpos específicos anti-leishmania, nomeadamente imunoglobulinas do tipo IgG. Apresentam alta especificidade e sensibilidade, exigindo contudo para a obtenção de um diagnóstico seropositivo, a presença de um elevado nível de anticorpos na circulação sanguínea (Gradoni, 2002). O período de seroconversão dura cerca de 1 a 3 meses, sendo impossível a deteção de anticorpos neste período (Campillo *et al.*, 1999). Uma percentagem variável dos doentes desenvolvem sintomatologia clínica e apresentam altos títulos de anticorpos, enquanto que outros (mais resistentes) podem apresentar uma titulação de anticorpos fracamente positiva ou indetetável (Quinnell *et al.*, 2001). A titulação de anticorpos deve ser repetida no mesmo laboratório 6 meses após o início do tratamento devido à longa semi-vida da imunoglobulina IgG. A utilização

desta na monitorização do tratamento é controversa, uma vez que alguns estudos mostram que a mesma não diminui nos primeiros meses após o tratamento, não sendo por isso, um método satisfatório para a monitorização do desenvolvimento clínico da doença. Adicionalmente parece não existir uma correlação entre o nível de anticorpos e a gravidade dos sinais clínicos (Ferrer *et al.*, 1995; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Contudo, estudos mais recentes demonstram que há uma diminuição lenta e progressiva das imunoglobulinas IgG e IgA, associadas a uma recuperação do estado clínico do doente (Rodriguez *et al.*, 2006). Um estudo realizado por Vercammen *et al.*, em 2002 demonstrou que a quantificação da IgG2, pela realização do teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), é ser um bom marcador da eficácia terapêutica uma vez que é possível verificar uma diminuição da sua concentração em situações em que o tratamento é bem sucedido (Vercammen *et al.*, 2002).

Assim, alguns doentes vão apresentar uma diminuição significativa na titulação de anticorpos associada a uma melhoria clínica ao fim de 6 a 12 meses de tratamento, já outros podem nunca vir a apresentar uma diminuição dos níveis de anticorpos apesar de apresentarem melhorias clínicas. Contudo, um aumento abrupto no título de anticorpos é sempre interpretado como um sinal de recidiva em indivíduos que descontinuem o tratamento (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Tem vindo a ser sugerido que pacientes clinicamente saudáveis, mas que apresentem seropositividade sejam segregados consoante o título de anticorpos que exibem, ou seja, doentes com altos níveis de anticorpos devem ser tratados como doentes; enquanto que os cães que apresentem baixos níveis de anticorpos devem ser novamente testados e monitorizados a cada 3-6 meses. Estas técnicas apresentam como desvantagem o aparecimento de falsos-positivos devido à reactividade cruzada com outras doenças nomeadamente a Ehrlichiose, a Rickettsiose e a Toxoplasmose (Gomes *et al.*, 2008).

5.1.1. Imunofluorescência Indireta

A Imunofluorescência Indirecta (IFI) é considerada o método eleição/padrão dentro dos métodos serológicos, sendo recomendada a sua utilização como técnica de primeira linha pelo Gabinete Internacional de Doenças Epizoóticas (Office International Epizooties) (Gradoni, 2002). Esta técnica permite detetar e quantificar os anticorpos presentes no soro de um animal infetado através de uma série de diluições do mesmo com antigénios provenientes do parasita da *Leishmania*, sendo adicionado, posteriormente, um anti-anticorpo conjugado com fluoresceína para futura visualização num microscópio de fluorescência (Kaneko *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Este método apresenta uma alta especificidade e sensibilidade para a detecção de Leishmaniose Canina, considerando-se positivo uma titulação de anticorpos nas diluições de 1/40 a 1/160, consoante os diferentes laboratórios. A presença de altas titulações serológicas associada a manifestações clínicas típicas da doença é considerada sempre um diagnóstico confirmativo da doença, enquanto a presença de uma titulação de anticorpos que se encontre no limiar da positividade requer, ou a repetição do exame passado 3 a 4 meses, ou a confirmação por outros métodos de diagnóstico (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Outros testes serológicos de diagnóstico, tais como o método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), baseado na reação antígeno-anticorpo e o Teste de Aglutinação Direta, baseado na formação de agregados de anticorpos e antígenos, são também muito utilizados (Vulpiani *et al.*, 2011).

5.1.2. Testes rápidos imunocromatográficos

Os testes rápidos imunocromatográficos têm vindo a ser cada vez mais utilizados uma vez que são fáceis de usar e apresentam resultados qualitativos no local. Contudo, apesar de apresentarem uma boa especificidade a sua sensibilidade é variável (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

5.2. PCR (Reação de Polimerase em Cadeia)

A utilização de técnicas de biologia moleculares, como o PCR (Reação de Polimerase em Cadeia, *Polimerase Chain Reaction*, em inglês) que tem como objetivo a detecção de ácido desoxirribonucleico (ADN) do parasita nos tecidos de um indivíduo suspeito de doença, permite um diagnóstico exacto e específico (Quinnell, 2001). Pode utilizar-se amostras de sangue, pele, gânglios linfáticos, conjuntiva e medula óssea onde é possível a detecção da presença de ADN de *Leishmania* em tecidos ou sangue de indivíduos clinicamente saudáveis que habitam zonas endémicas, indicando que os mesmos são portadores da infeção, podendo mesmo não vir a desenvolver sinais clínicos da doença (Quinnell, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Em contrapartida a presença de uma titulação de anticorpos elevada em indivíduos clinicamente saudáveis pode significar o desenvolvimento de uma futura doença clínica (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

5.3. Microscopia e Cultura

O diagnóstico de Leishmaniose pode ser confirmado pela observação direta das formas amastigotas em amostras provenientes de animais infetados (método directo), ou através da deteção de formas promastigotas em culturas realizadas a partir das mesmas (método indirecto). A visualização e deteção das formas amastigotas são normalmente provenientes de esfregaços citológicos dos gânglios linfáticos, medula óssea e baço (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A forma promastigota pode ser isolada através da colocação de amostras de animais infetados em meios de cultura sólidos, nomeadamente o meio NNN (Nicole-Novy-McNeal), podendo ser observado um crescimento ao fim de 3 dias de incubação a uma temperatura de entre 22 e 26°C. Contudo, outros meios de cultura líquidos podem ser utilizados, nomeadamente o meio de cultura RPMI-1640 e o meio Schneider, enriquecidos com vitaminas, aminoácidos e outros constituintes essenciais para o crescimento celular (Singh, 2006). Estes 2 métodos de diagnóstico apesar de apresentarem alta especificidade (100%), demonstram uma baixa sensibilidade (60%) devido ao facto de uma grande parte das amostras dos gânglios linfáticos e medula óssea apresentarem baixa densidade parasitária (Gradoni, 2002).

5.4. Outros Testes

Indivíduos considerados resistentes apresentam uma forte resposta imune de tipo celular, na tentativa de avaliar essa resposta, alguns testes como o Teste de Montenegro, são utilizados. Este é baseado na resposta de hipersensibilidade tardia e consiste na inoculação intradérmica de formas promastigotas da *Leishmania*, com posterior avaliação às 48 e 72 horas. Doentes que apresentem uma infecção subclínica, que se encontrem numa fase inicial da doença ou aqueles que respondem eficazmente ao tratamento irão apresentar uma reacção no local da inoculação sendo o resultado considerado positivo (Solano-Gallego *et al.*, 2001).

6. Terapêutica

O tratamento de animais com Leishmaniose é complexo e não totalmente eficaz. A eliminação total do parasita com os fármacos disponíveis é rara pelo que na maioria

das vezes apenas se consegue uma remissão dos sinais clínicos (cura clínica) (Campillo *et al.*, 1999).

Apesar dos protocolos de tratamento melhorarem a condição clínica do doente, estes não previnem o aparecimento de recidivas que normalmente ocorrem ao fim de 6 meses até 2 anos após o final do tratamento (Baneth, 2002). Estudos publicados em 2011 utilizando diferentes protocolos terapêuticos, demonstraram uma redução da infeciosidade dos animais infetados para os insetos vetores, sugerindo que os animais sujeitos a tratamento não irão desempenhar um papel primordial na propagação da doença, o que diminuiu os riscos epidemiológicos para o homem e restantes animais (Miró *et al.*, 2011). Para a realização de um tratamento adequado é necessário a obtenção de um diagnóstico precoce e uma avaliação do estado geral do doente (Campillo *et al.*, 1999; Noli, 1999). Após o tratamento, é necessária a monitorização do mesmo através da repetição de exames realizados após o primeiro ciclo de tratamento e depois a cada 3 a 6 meses. Se após um ciclo de tratamento o indivíduo não evoluir positivamente, deve instituir-se uma nova terapêutica a qual poderá passar pela mudança do fármaco ou da dose utilizada inicialmente (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A grande maioria dos doentes apresenta uma melhoria significativa no primeiro mês de terapêutica, contudo para outros é necessário um tratamento prolongado para que se possam observar melhorias clínicas (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Os fármacos atualmente licenciados na Europa para o tratamento específico de Leishmaniose Canina são o antimoniato de meglumina, a miltefosina e a aminosidina. (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

6.1. Antimoniais Pentavalentes

Os Antimoniais Pentavalentes (Sb5+) têm sido utilizados como fármacos de primeira escolha no tratamento de leishmaniose canina e humana (Greene, 2006). O seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição das enzimas protozoárias responsáveis pela glicólise e oxidação de ácidos gordos, bloqueando deste modo o seu metabolismo (Baneth, 2002). Dois compostos são normalmente utilizados: o Antimoniato de Meglumina e o Estibogluconato de Sódio, sendo que o primeiro é o mais utilizado (Greene, 2006). Como não é absorvido, se for dado por via oral, o antimoniato de meglumina deve ser injetado diariamente por via intramuscular (IM), subcutânea (SC) ou endovenosa (EV) o que pode causar alguns efeitos adversos como claudicações, inflamações locais e tromboflebites (Noli, 1999; Greene, 2006). O protocolo terapêutico mais utilizado consiste na administração de uma dose diária de

75 a 100mg/kg, a cada 24 horas (SID) ou 40 a 75mg/kg a cada 12 horas (BID), SC, durante um período de 3 a 4 semanas (Solano-Gallego *et al.*, 2011). A farmacocinética deste fármaco demonstra que 80% é excretado na urina ao final de um período de 9 horas após a sua administração, sendo uma pequena parte reduzida ao seu composto tóxico, os antimoniais trivalentes (Sb³⁺), os quais se acumulam no organismo (Greene, 2006). A administração da dose recomendada deste fármaco raramente causa sinais de toxicidade, a menos que seja administrado diariamente num período superior a 2 meses ou administrado em pacientes com problemas cardíacos, renais ou hepáticos (Greene, 2006). Em doentes que apresentam insuficiência renal e hepática, é utilizada a dose de 50mg/Kg/SID com o objetivo de minimizar os efeitos secundários deste fármaco. A utilização deste fármaco pode ser dispendioso e causar resistências (Baneth, 2002; Vulpiani *et al.*, 2011).

6.2. Análogos das Purinas

O alopurinol é um análogo da purina, sendo metabolizado pelo parasita da *leishmania* e incorporado no seu ácido ribonucleico (ARN), provocando alterações na tradução proteica e consequentemente interrupção da multiplicação do parasita, apresentando deste modo uma atividade leishmanióstática (Noli, 1999). Tem como vantagens o fato de ser menos dispendioso, apresentar bons resultados no melhoramento do quadro clínico do doente, ser de administração oral e apresentar poucos efeitos adversos (Greene, 2006). A dose recomendada pode variar amplamente, contudo, está recomendada a utilização de uma dose de 10mg/kg/BID, via oral durante 6 a 12 meses (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Quando administrado durante um período de 2 a 3 meses, permite melhoramento clínico moderado assim como a restauração dos parâmetros bioquímicos, em particular das proteínas de fase aguda (PFA) resultantes da inflamação (Farca *et al.*, 2012).

6.3. Associação dos antimoniais pentavalentes com alopurinol

O uso isolado de antimoniato de meglumina não previne o aparecimento de recidivas, por isso é comum a combinação deste último com outro fármaco, nomeadamente o alopurinol, constituindo assim o protocolo de primeira linha utilizado no tratamento de

Leishmaniose Canina (Greene, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Os doentes tratados com este protocolo demonstram um longo período de remissão clínica, comparativamente aos que apenas realizam o tratamento com apenas um só fármaco (Farca *et al.*, 2012). Após o fim da terapêutica combinada, recomenda-se o uso do alopurinol durante os 6 e 10 meses seguintes, sendo que a duração do tratamento com o mesmo vai depender da gravidade da doença, da resposta clínica e parasitológica e da tolerância individual a este fármaco. A descontinuação do alopurinol deve ser realizada na presença de uma recuperação física e clinicopatológica assim como na presença de uma diminuição significativa da titulação de anticorpos. Também deve ser feita uma descontinuação se não for possível controlar a xantínúria, evitando, deste modo o risco de urolitíase (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

6.4. Miltefosina

A miltefosina aprovada para o uso em canídeos, oferece uma nova opção de terapêutica e de estratégia alternativa no controlo da Leishmaniose Canina. Trata-se de uma molécula com atividade anti-tumoral e anti-protozoária com uma via de administração oral na dose de 2 mg/kg/SID durante 28 dias para o controlo da leishmaniose (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Apresenta baixa toxicidade, embora alguns efeitos gastrointestinais tenham sido reportados, como vómitos e diarreia (Vulpiani *et al.*, 2011). Apresenta também um potencial efeito teratogénico, estando contraindicada a sua utilização em cadelas gestantes. Em machos tratados com miltefosina está descrita uma diminuição do ejaculado, não se podendo afirmar a existência de um efeito direto no sistema reprodutor masculino, causada por este fármaco (Dorlo *et al.*, 2012).

Tal como os outros fármacos, a miltefosina não tem a capacidade de eliminar totalmente o parasita em indivíduos infetados, limitando-se a uma redução da carga parasitária presente em amostras dos linfonodos (Farca *et al.*, 2012).

6.5. Anfotericina B

A Anfotericina B é um antifúngico que apresenta uma boa eficácia contra alguns protozoários, estando limitada a sua utilização devido uma série de desvantagens, como a alta nefrotoxicidade (Noli, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Para minimizar os seus efeitos secundários, deve ser diluído numa solução glicosada e administrado por via endovenosa lenta, uma vez ao dia, em dias alternados, numa dose de 0,5 a 0,8 mg/kg, durante 2 meses (Noli, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

6.6. Pentamina

A pentamina é uma diamina aromática que tem a capacidade de interferir com o ADN do protozoário, sendo administrado por via intramuscular na dose de 4mg/kg, duas vezes por semana, durante 4 a 7 semanas (Baneth, 2002; Noli & Auxilia 2005). Pode provocar irritação muscular no local da injeção, hipotensão, taquicardia e vômitos. (Greene, 2006).

6.7. Aminosidina

A aminosidina é um antibiótico aminoglicosídeo que atua por modificação da síntese proteica do parasita, podendo ser administrado na dose de 5 mg/Kg BID, via IM ou SC, durante 3 a 4 semanas (Noli & Auxilia, 2005). Não deve utilizado como terapia de primeira escolha em quadros de leishmania devido à sua elevada nefro- e ototoxicidade (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A maioria dos fármacos utilizados no controlo da doença não consegue assegurar uma eliminação total da carga parasitária e apresenta alta toxicidade. Outros fármacos como o metronidazol, o cetoconazol, a espiamicina, a marbofloxacina e a enrofloxacin têm vindo a ser avaliadas na terapêutica da Leishmaniose (Solano-Gallego *et al.*, 2009, Farca *et al.*, 2012).

Recentemente, um novo produto imunomodulador baseado numa suspensão oral de domperidona, foi disponibilizado para o tratamento e prevenção da Leishmaniose (Gómez-Ochoa *et al.*, 2012). A domperidona atua como antagonista da dopamina, promovendo a libertação de serotonina, a qual estimula a produção de prolactina. Esta última, promove a resposta imunitária celular do tipo Th1, com respetiva produção de IL-2, IL-12, INF- γ e TNF α , levando à ativação dos macrófagos e respetiva morte celular. Trata-se de um medicamento que apresenta como vantagens o fato de ser de ser administrado por via oral, não ser dispendioso e poder ser utilizado em doentes com insuficiência renal, a qual é uma das mais frequentes complicações da leishmania (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009). Em animais não infetados pode funcionar como um método preventivo, uma vez que a administração repetida promove um aumento da capacidade fagocítica dos neutrófilos e monócitos, aumentando assim a resistência à infeção. O protocolo utiliza o fármaco na dose de 0,5 mg/kg/SID, durante 30 dias consecutivos, de 4 - 4 meses, começando na época de início de atividade do flebótomo (Maio e Junho) (Llinás *et al.*, 2011).

O prognóstico da leishmaniose canina é difícil de estabelecer e vai depender da condição clínico-patológica inicial do doente e da sua resposta específica à terapêutica instituída (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

7. Controlo e prevenção

O controlo da Leishmaniose Canina tem como objetivo a redução do número de casos de leishmaniose. Esta ainda poderá traduzir-se numa diminuição de prevalência em humanos. Deste modo, é necessário implementar métodos de controlo de modo a evitar a transmissão e progressão da doença (Vulpiani *et al.*, 2011).

A manutenção dos animais dentro de casa na hora de maior atividade do flebótomo, a redução dos micro-habitats favoráveis ao desenvolvimento do inseto e o uso de inseticidas ambientais e tópicos, são exemplos de métodos preventivos utilizados. A utilização de inseticidas tópicos à base de piretróides sintéticos em variadas concentrações tem uma ação repelente e tóxica muito forte, suficiente para desorientar e irritar o inseto, resultando na ausência ou diminuição da sua alimentação e inclusivé na sua morte contribuindo não só na prevenção da picada, mas também na diminuição do número de flebótomos infetados. Podem ser utilizados em forma de colar impregnado com deltametrina a qual promove uma proteção durante 6 meses, em forma de spot-on tópico com permetrina a 50% e imidaclopride a 10% com uma duração de ação de aproximadamente 3 a 4 semanas e em forma de sprays à base de 1.9% de permetrina e 0.02% de piriproxifen (Vulpiani *et al.*, 2011).

A utilização de inseticidas ambientais, como os DDT (*Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane*), tem vindo a ser debatida, uma vez que apresenta altos custos, dificuldades na aplicação e possibilidade de ocorrerem resistências, contudo, este método pode ser bastante efetivo, uma vez que a diminuição dos vetores leva a uma diminuição da transmissão (Vulpiani *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de vacinas que confirmam imunidade contra a leishmaniose representa um método eficaz no controlo da leishmaniose humana (Giunchett *et al.*, 2008). Atualmente três vacinas estão licenciadas e a ser comercializadas, duas no Brasil, e apenas uma na Europa. A Leishmune®, vacina viva atenuada e foi a primeira vacina a ser comercializada em 2003 no Brasil, a qual utiliza um antigénio purificado isolado de promastigotas da espécie *Leishmania donovani*, associado a um adjuvante, a saponina, que potencia a resposta a imunitária, aumentando o número de linfócitos CD8+ citotóxicas. Trata-se de uma vacina que induz um padrão imunológico caracterizado pelo aumento dos níveis INF- γ , óxido nítrico (NO), assim como a

promoção da ativação precoce e da persistência dos neutrófilos e monócitos. Apresenta bom efeito protetor (98%) e uma ação imunoterapêutica quando utilizada uma dose de saponina superior. (Palatnik-de-Sousa, 2012). A outra vacina em comercialização é a Leish-Tec®, uma vacina proveniente de DNA antigénico, lançada em 2008 no Brasil e consiste numa vacina recombinante que expressa o antigénio A2 da *L. donovani*, associada a uma saponina, como adjuvante (Vulpiani *et al.*, 2011). Ao contrário da Leishmune, que foi exaustivamente investigada, apenas alguns estudos testando a eficácia desta vacina foram elaborados e publicados (Palatnik-de-Sousa, 2012). No início de 2011, uma nova vacina de nome CaniLeish® foi licenciada e comercializada na Europa, sendo lançada inicialmente em Portugal, Espanha, Itália, França e Grécia, apresentando 92% de eficácia. É uma vacina cujo antigénio consiste em proteínas denominadas Secretadas-Excretadas (ESP) resultantes de sobrenadantes de culturas de *Leishmania infantum* e apresenta como adjuvante uma saponina purificada (Palatnik-de-Sousa, 2012). A resposta imune é caracterizada pela presença de uma linfoproliferação, ocorrendo um aumento do número de linfócitos T produtores de INF- γ , o que aumenta a atividade leishmanicida por parte dos macrófagos, reduzindo assim, a carga parasitária intracelular. Para além destes efeitos, também estimula a eliminação das formas amastigotas intracelulares pela indução da via de óxido nítrico (NO) (Moreno *et al.*, 2012; Palatnik-de-Sousa, 2012)

8. Leishmaniose e Saúde Pública

Por todo o mundo, existem cerca de 12 milhões de pessoas infetadas e 350 milhões estão em risco de contrair a doença (Greene, 2006). A leishmaniose visceral afeta sobretudo crianças, contudo atualmente o número de casos em indivíduos imunocomprometidos, como os infetados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou os que recebem fármacos imunossuppressores, tem vindo a aumentar (Greene, 2006). Apenas um estudo realizado no Irão demonstra que os donos de animais infetados apresentam um risco elevado de adquirir a doença. Não existe contudo uma relação evidente entre a prevalência da Leishmaniose em canídeos e a prevalência em humanos, uma vez que a infeção nos animais é muito mais prevalente e amplamente distribuída do que nos humanos, e é ainda de notar que a maioria dos insetos vetores são maioritariamente zoofílicos. (Cortes *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009) Contudo, a presença de cães infetados que atuam como reservatório, constitui um papel importante na manutenção da infeção (Campino & Maia, 2010).

9. Marcadores laboratoriais

A utilização de proteínas séricas como marcadores laboratoriais pode ser muito útil na diagnóstico e prognóstico de diversos processos patológicos (Cerón *et al.*, 2005). As proteínas são macromoléculas encontradas em todos os sistemas biológicos, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos (Cozzone, 2002). Estão envolvidas em inúmeros processos biológicos e apresentam variadas funções tais como a manutenção da pressão osmótica, catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, transporte de moléculas e iões, efeito tampão para o equilíbrio ácido-básico, coagulação sanguínea, regulação da resposta inflamatória e defesa do organismo, entre outras (Thomas, 2000).

Das proteínas plasmáticas fazem parte a albumina, as globulinas e o fibrinogénio; enquanto que as proteínas séricas englobam na sua grande maioria a albumina e as globulinas, já que o fibrinogénio é totalmente consumido no fenómeno da coagulação, resultando numa maior concentração de proteínas no plasma relativamente ao soro. Com exceção das imunoglobulinas (produzidas pelos órgãos linfóides) a maioria das proteínas plasmáticas, incluindo a albumina, são sintetizadas pelo fígado (Meyer & Harvey, 2004). A concentração proteica no sangue, não reflete a reserva total de proteínas presentes no organismo e o tempo de semi-vida de cada uma delas varia consoante a espécie, sendo inversamente proporcional ao tamanho do indivíduo. O catabolismo proteico realizado pelos tecidos permite uma renovação contínua das proteínas plasmáticas em circulação através dos aparelhos gastrointestinal e urinário, contribuindo assim, para a diminuição da concentração plasmática das mesmas, pelo que estas perdas têm de ser compensadas pela alimentação e por um aumento da sua produção assegurada pelo fígado (Thomas, 2000).

Para que seja possível identificar e quantificar as proteínas séricas é necessário proceder à separação de cada componente proteico recorrendo a diversas técnicas. Primariamente a divisão ocorre entre a albumina e as globulinas, onde as concentrações das proteínas totais e da albumina são quantificadas diretamente através de métodos bioquímicos. A concentração total de globulinas não é determinada diretamente, mas sim calculada através da subtração da concentração da albumina da concentração total de proteínas. As globulinas são um grupo heterogéneo de proteínas, que desempenham uma grande variedade de funções fisiológicas e podem ser classificadas em alfa (α), beta (β) ou gama (γ), após a realização de uma eletroforese (Meyer & Harvey, 2004). Em certo tipo de patologias, verifica-se um aumento ou uma diminuição da concentração destas globulinas provocando alterações ao nível do perfil eletroforético (Thomas, 2000).

10. Proteínas de Fase Aguda

Quando ocorre uma perturbação na homeostasia devido a uma infeção, inflamação, trauma, neoplasia, entre outros, há um aumento de algumas globulinas designadas de proteínas de fase aguda (PFA). A libertação de citocinas inflamatórias, tais como a IL1, IL6 e TNF- α , estimulam os hepatócitos a sintetizar para a corrente sanguínea algumas destas globulinas responsáveis pela resposta orgânica de fase aguda (Tabela 1) (Meyer & Harvey, 2004).

Proteínas de Fase Aguda Positivas	Proteínas de Fase Aguda Negativas
Proteína C Reativa	Albumina
Proteína Amilóide A Sérica	Transferrina
Haptoglobina	
Ceruloplasmina	
α_2 – Macroglobulina	
α_1 -Glicoproteína ácida	
α_1 -Antitripsina	
Ferritina	
Fibrinogénio	

Tabela 1. Principais Proteínas de Fase Aguda reportadas nos animais domésticos (Adaptado de Thomas, 2000).

Estas proteínas estão envolvidas na regulação da resposta imunitária, na inflamação e na reparação tecidual. Assim, cada PFA pode apresentar efeitos pró e anti-inflamatórios, existindo um balanço entre os mesmos. A resposta de fase aguda dura geralmente alguns dias, apresentando um papel importante nos mecanismos de defesa inatos do organismo, contudo, aumentos nas PFA já foram detetados em inflamações crónicas. A maioria destas proteínas migra nas regiões α e β após realização de uma electroforese de proteínas séricas, observando-se um aumento destas frações em situações de resposta de fase aguda (Cerón *et al.*, 2005).

Ao mesmo tempo em que há um aumento das PFA, existe consecutivamente uma diminuição na produção de outras proteínas plasmáticas como a albumina e a transferrina, denominadas de proteínas de fase aguda negativas, já que diminuem a sua concentração em mais de 25% durante a fase de resposta aguda em resposta à inflamação, infeção e trauma. Como já foi referido, a albumina é uma PFA negativa e a sua concentração diminui gradualmente, sendo mais acentuada na presença de uma

doença inflamatória crónica (Meyer & Harvey, 2004; Eckersall, 2008). O mecanismo que envolve a diminuição da concentração destas proteínas não está bem esclarecido, contudo, a diminuição da albumina poderá estar relacionada com um aumento da permeabilidade vascular provocada pela inflamação, a qual permite um extravasamento da mesma para o espaço extravascular, diminuindo assim a sua concentração intravascular (Thomas, 2000; Eckersall, 2008). A presença de um processo inflamatório também é responsável pela diminuição da síntese desta proteína, devido não só à presença de citocinas pró-inflamatórias como também devido a um aumento da taxa fracional catabólica (TFC), correspondente à quantidade de albumina plasmática que é catabolizada por unidade de tempo, contribuindo assim, para uma diminuição da sua concentração sérica (Don & Kaisen, 2004; Santos *et al.*, 2004). A resposta de fase aguda é uma resposta rápida que se desenvolve muito antes da resposta imunitária específica e muito frequentemente antes do desenvolvimento dos sinais clínicos. Assim, as PFA podem ser consideradas como bons marcadores precoces de qualquer processo patológico, pelo que a sua deteção antecipada é útil (Cerón *et al.*, 2005). Estudos efectuados em Medicina Veterinária demonstram que a quantificação das PFA fornece uma informação clínica útil no diagnóstico, prognóstico e monitorização terapêutica de diversos processos patológicos (Martínez-Subiela & Céron, 2005).

11. Eletroforese de Proteínas Séricas

O termo eletroforese está relacionado com a migração de partículas carregadas num campo eléctrico. Em 1937, Arne Tiselius desenvolveu uma técnica chamada eletroforese livre, realizada em meio líquido, onde as substâncias a serem separadas apresentavam-se em suspensão ou solução. Este método veio a revelar-se limitado uma vez que sofre influências ambientais, como a presença de uma convecção térmica resultante de um aquecimento da solução devido à aplicação do potencial eléctrico (Keren, 2003, Westermeier, 2005). Assim, de modo a minimizar estes problemas, desenvolveram-se as eletroforeses de zona ou de suporte, as quais são efetuadas em meios adequados como o papel, gel de agarose, acetato de celulose, gel de poliacrilamida e gel de amido que proporcionam um suporte estável no qual as proteínas podem migrar, serem coradas e quantificadas. (Keren, 2003, Westermeier, 2005). A eletroforese é uma técnica que permite separar componentes do soro, urina e proteínas do líquido cefalorraquidiano, possibilitando a quantificação de proteínas numa amostra (Keren, 2003; Eckersall, 2008). O soro ou plasma são colocados num

meio específico, no qual ao serem submetidos a um campo elétrico, as diferentes frações proteicas migram com diferentes velocidades (O'Connell *et al.*, 2005). A migração das proteínas depende das suas propriedades físicas, tais como tamanho, forma, carga e peso molecular. O pH, a composição do tampão iônico e a intensidade do campo elétrico a que as proteínas ficam sujeitas também influenciam a sua migração (Eckersall, 2008). As proteínas são substâncias anfotéricas, o que implica que em presença de um meio alcalino irão comportar-se como ácidos fracos, libertando um próton e ficando com uma carga negativa ocorrendo o inverso em meio ácido (Keren, 2003). Ao serem colocadas num pH alcalino as proteínas irão apresentar uma carga negativa, migrando para o ânodo e inversamente, num pH ácido, irão apresentar uma carga positiva e migrar em direção ao cátodo. A eletroforese é normalmente realizada em meios com pH básicos (pH=8.6) apresentando assim a maioria das proteínas carga negativa, dirigindo-se para o ânodo (Eckersall, 2008). Após a migração proteica, estas são coradas, de modo a se poderem visualizar as frações na forma de bandas com coloração de intensidade variável (Figura 5) sendo as suas densidades calculadas eletronicamente por um densitómetro, permitindo a obtenção de um traçado eletroforético (O'Connell *et al.*, 2005). É também possível a obtenção de uma impressão com a representação gráfica das leituras de absorção realizadas pelo densitómetro, assim como das percentagens de proteínas por fração, gerados por computador (Eckersall, 2008).

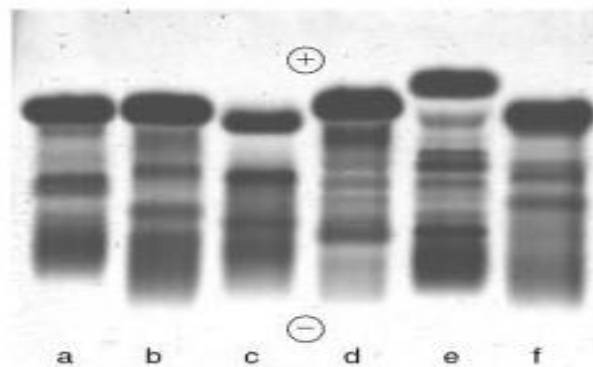


Figura 5. Eletroforese proteínas séricas em gel de agarose, demonstrando as várias frações proteicas em forma de bandas com coloração variável de diferentes espécies animais saudáveis. a – ovelha; b- vaca; c – porco; d- cão; e- gato; f- cavalo (Adaptado de Eckersall, 2008).

O fracionamento proteico por eletroforese permite a divisão em 4 frações: albumina, alfa (α) globulina, beta (β) globulina e gama (γ) globulina. Nos animais domésticos estas frações ainda podem ainda ser subdivididas em duas bandas: $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$ e γ globulinas (Eckersall, 2008). O grau de migração da albumina e das frações proteicas varia entre espécies e o número de frações obtidas vai depender da espécie mas também das condições laboratoriais. (Thomas, 2000). O soro é geralmente utilizado ao invés do plasma, uma vez que o fibrinogénio presente no plasma migra na região β e γ , dificultando deste modo a interpretação dos resultados (Meyer & Harvey, 2004). A albumina apresenta uma alta carga negativa pelo que é a proteína com maior mobilidade em direção ao ânodo, ao contrário das globulinas que apresentam uma carga negativa mais fraca, e portanto uma mobilidade intermédia, mantendo-se as γ - globulinas perto do ponto de origem (Figura 6) (Thomas, 2000).

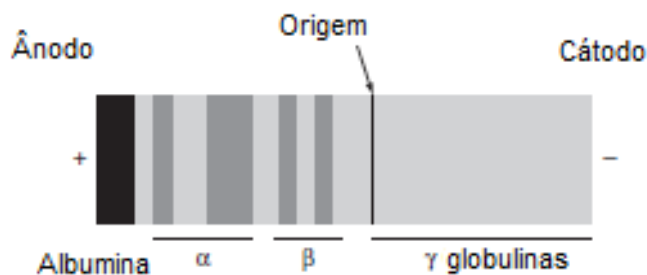


Figura 6. Migração das diferentes frações proteicas em meio alcalino (Adaptado de Keren, 2003)

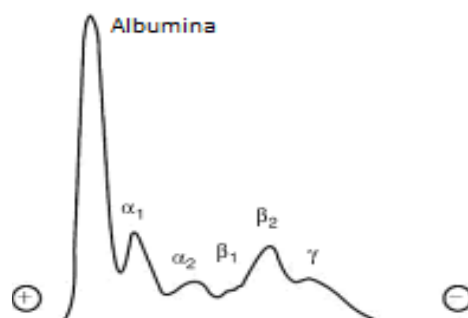


Figura 7. Traçado eletroforético de um cão saudável realizado em gel de agarose (Adaptado de Eckersall, 2008)

Um traçado eletroforético considerado normal consiste num pico de albumina, seguida das globulinas, α_1 , α_2 , β e γ (Figura 7) (O'Connell *et al.*, 2005).

11.1. Albumina

A albumina representa cerca de 35% a 50% das proteínas séricas totais, sendo por isso a proteína mais abundante no soro (Eckersall, 2008). Sintetizada no fígado, pelos hepatócitos tem um papel muito importante na manutenção da pressão oncótica do sangue, sendo muito importante no transporte pois liga-se a substâncias como o cálcio, ácidos gordos, bilirrubina, hormonas, entre outros (Meyer & Harvey, 2004). A largura da banda da albumina considerada normal está relacionada com a sua alta concentração sérica e com as diferentes cargas e tamanhos das moléculas por ela transportadas (Keren, 2003).

11.2. Fração alfa

A fração alfa subdivide-se nas subfrações α_1 e α_2 . A **fracção α_1** é constituída principalmente pela proteína α_1 -antitripsina que corresponde a cerca de 90% do pico normal desta região. É uma importante inibidora de proteases, uma vez que limita as ações das enzimas proteolíticas libertadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário, durante a presença de um processo inflamatório agudo, sendo por isso considerada uma PFA positiva (Meyer & Harvey, 2004). A sua concentração encontra-se aumentada na presença de uma reação inflamatória aguda, processos infecciosos e processos imunes e contrariamente, diminuída em casos de cirrose hepática e na presença de uma doença pulmonar crónica (Meyer & Harvey, 2004; Silva *et al.*, 2008). Para além desta última, também fazem parte da região α_1 , a proteína α_1 -glicoproteína ácida e as lipoproteínas de alta densidade (Tabela 2) (O'Connell, 2005; Eckersall, 2008). A α_1 -glicoproteína ácida é uma proteína altamente glicosada que apresenta uma ação anti-inflamatória e imunomoduladora, sendo por isso uma PFA positiva cuja sua concentração aumenta em resposta à inflamação e a processos neoplásicos e está diminuída na presença de uma insuficiência hepática, síndrome nefrótica e em condições de má nutrição (Eckersall, 2008). Tem a capacidade de se ligar a variados fármacos nomeadamente ao fenobarbital, pelo que há um aumento da sua concentração em doentes tratados com o mesmo (Meyer & Harvey, 2004; Céron *et al.* 2005). As lipoproteínas de alta densidade, presentes na região α_1 são responsáveis

pelo transporte do colesterol dos tecidos para o fígado, num processo denominado de transporte reverso do colesterol (Meyer & Harvey, 2004).

A **fração α_2** é constituída pela haptoglobina, a alfa-2 macroglobulina e a ceruloplasmina (Tabela 2) (O'Connell, 2005). A haptoglobina é uma glicoproteína que migra na região α_2 e que forma um complexo proteico com a hemoglobina livre proveniente da lise dos eritrócitos, sendo posteriormente eliminada do plasma pelos hepatócitos e macrófagos. Em caso de hemólise intravascular, ocorre uma diminuição na concentração da haptoglobina, sendo por isso um indicador sensível da presença de síndromes hemolíticas. Apresenta uma ação protetora contra infeções bacterianas, uma vez que ao ligar-se à hemoglobina livre nos tecidos infetados, limita a quantidade de ferro disponível para o crescimento bacteriano e apresenta também uma ação antioxidante já que a hemoglobina causa lesões oxidativas nos tecidos. É, por isso uma PFA que está aumentada na presença de processos inflamatórios, infecciosos e lesões tecidulares. Os cães tratados com corticosteróides apresentam também um aumento da concentração da haptoglobina, sendo esta proteína sensível aos mesmos. A ceruloplasmina é uma glicoproteína transportadora de cobre, necessário para a cicatrização de feridas e formação de colagénio e apresenta também um efeito antioxidante, protegendo as células e tecidos (Céron *et al.*, 2005) Trata-se de uma PFA positiva moderada e o seu aumento pode ser observado na presença de processos inflamatórios e infecciosos. A α_2 macroglobulina é também uma glicoproteína inibidora de proteases, sendo considerada uma PFA positiva (Meyer & Harvey, 2004). A sua concentração aumenta na presença de hepatite (aguda ou crónica) e na síndrome nefrótica (neste último caso devido ao seu elevado tamanho, o que dificulta a sua passagem pelo nefrónio) (Thomas, 2000).

11.3. Fração beta

A fracção beta também pode subdividir-se nas subfracções β_1 e β_2 e é constituída por algumas PFA, lipoproteínas de baixa densidade, componente C3 do complemento e algumas imunoglobulinas (Tabela 2). As PFA que migram nesta região incluem a Proteína-C-Reativa (PCR), Proteína Amilóide A Sérica, a ferritina, o fibrinogénio (no caso de a electroforese ser realizada com plasma) e a transferrina (Thomas, 2000; Silva *et al.*, 2008). A Proteína-C-Reativa é a principal PFA em cães e está envolvida na modulação da resposta inflamatória. Tem a capacidade de se ligar a alguns agentes infecciosos e a células lesadas, ativando a cascata do complemento levando ao fenómeno de opsonização (Meyer & Harvey, 2004). Está presente em pequenas

quantidades em animais saudáveis. Em alguns casos, a elevação da sua concentração parece estar diretamente relacionada com a gravidade da reação inflamatória. O seu aumento pode também estar relacionado com neoplasias, insuficiência hepática e insuficiência renal, doenças infecciosas, entre outros (Thomas, 2000). A Proteína Amilóide A Sérica é também considerada uma das principais PFA no cão, sendo importante na regulação do processo inflamatório, uma vez que é responsável pelo recrutamento de células inflamatórias para o local de infecção, estando também envolvida no metabolismo e transporte de lípidos (Céron *et al.*, 2005; Zaias *et al.*, 2009). A ferritina é também uma PFA positiva que consiste numa cadeia de polipéptidos responsáveis pelo armazenamento de ferro aumentando a sua concentração na presença de processos inflamatórios. A presença de uma anemia hemolítica, assim como um excesso de ferro em circulação também contribuem para um aumento desta molécula em circulação, estando a sua diminuição relacionada com a presença de deficiências em ferro e com a presença de perda de sangue (Thomas, 2000). A transferrina é uma PFA negativa, produzida pelos hepatócitos cuja função é o transporte de ferro para os tecidos, apresentando por isso uma diminuição da sua concentração na presença de processos inflamatórios (Thomas, 2000; Meyer & Harvey, 2004). É contudo possível verificar um aumento da sua concentração em situações de deficiência em ferro e em hemorragias crónicas (Thomas, 2000). As imunoglobulinas IgM e IgA prolongam-se desde a região β para a região γ . Assim, em situações onde ocorra um aumento de produção de imunoglobulinas, como a resposta a um estímulo antigénico ou a presença de doenças linfoproliferativas, as mesmas podem migrar tanto na região β como na região γ (Kaneko, 1997). Quando não é possível observar uma separação clara entre a fração β e a fração γ , o resultado é a presença de um fenómeno designado “ponte β - γ ”. Este surge devido ao aumento da IgA e IgM, estando normalmente associado a processos hepáticos crónicos, linfoma e ainda a doenças infecciosas como a Dirofilariose e a Leishmaniose (Eckersall, 2008; Camus *et al.*, 2010). Da fração β também fazem parte as lipoproteínas de baixa densidade produzidas pelos hepatócitos, as quais têm como função o transporte de colesterol, através da corrente sanguínea para os tecidos periféricos, estando a sua concentração aumentada em doentes com hipotiroidismo, hiperadrenocorticism, pancreatite, colestase, síndrome nefrótica e obesidade (Xenoulis & Steiner, 2010).

11.4. Fração gama

Por fim, a fração gama nos animais domésticos contém as imunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE (Tabela 2) essenciais para a formação de uma resposta imunitária humoral eficaz (Thomas, 2000). As imunoglobulinas são produzidas pelos linfócitos B e pelos plasmócitos em resposta a um estímulo antigénico (Eckersall, 2008). Das imunoglobulinas totais presentes no plasma, 85% corresponde à IgG, 10% à IgM, 5% à IgA e 0,2% à IgE (Meyer & Harvey, 2004). A IgM é a primeira imunoglobulina a ser sintetizada, estando presente apenas no soro. A IgG é a principal imunoglobulina presente no plasma e é produzida numa fase mais posterior. A IgA está presente no soro e secreções e é produzida nos órgãos linfóides presentes nas mucosas do aparelho gastrointestinal, urinário, pulmonar, globo ocular e glândula mamária, constituindo uma defesa defensiva inata nessas localizações. Por último, a IgE apresenta a sua concentração aumentada na presença de reações de hipersensibilidade (Thomas, 2000).

α 1-globulinas	α 2-globulinas	β -globulinas	γ – globulinas
α ₁ -Antitripsina	α ₂ - Macroglobulina	Lipoproteínas de baixa densidade	IgG
α ₁ - Glicoproteína ácida	Ceruloplasmina	Ferritina	IgM
Lipoproteínas de alta densidade	Haptoglobina	Proteína C Reativa	IgA
		Fibrinogénio	IgE
		Transferrina	
		Proteína Amilóide A Sérica	
		IgM	
		IgA	
		Complemento C3	

Tabela 2. Principais proteínas constituintes das fracções α , β e γ .

Os perfis eletroforéticos modificados podem ser identificados num variado número de processos patológicos, contudo, o padrão de alterações dessas frações raramente é patognomónico de uma patologia específica, mas em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais, pode fornecer informação importante para diagnóstico clínico assumindo-se desta forma como um importante método auxiliar de diagnóstico de bioquímica clínica (Thomas, 2000; Eckersall, 2008).

12. Variações Fisiológicas

A presença de alterações ao nível do perfil eletroforético de proteínas séricas deve ser interpretado tendo em conta possíveis variações fisiológicas não associadas a doenças. Existem variações fisiológicas individuais normais que constantes durante um período considerável de tempo, deste modo a presença de pequenas mudanças ao nível das frações proteicas pode ser ou não significativo (Eckersall, 2008). Assim:

- 1) A idade do paciente deve ser levada em consideração uma vez que à nascença, tanto a concentração de albumina como de globulinas se encontra relativamente baixa. Após a ingestão do colostro, a concentração de globulinas começa a aumentar progressivamente devido à absorção intestinal das imunoglobulinas (Jain, 1993). Já em doentes geriátricos, verifica-se um aumento nas proteínas totais devido a uma leve diminuição da concentração albumina e a um aumento nas α e β globulinas (Batamuzi *et al.*, 1996);
- 2) O estado nutricional do doente também pode levar a alterações ao nível das frações proteicas, contudo estas alterações são subtis e difíceis de detetar e interpretar (Eckersall, 2008); e finalmente
- 3) a libertação de corticoesteróides endógenos pode provocar alterações ao nível das frações proteicas, ocorrendo uma diminuição das proteínas totais e da albumina e concomitantemente um aumento α_2 -globulinas associado a uma resposta de fase aguda (Eckersall, 2008).

13. Relação albumina/globulina (A/G)

Para uma melhor classificação do perfil electroforético do paciente deve ter-se em consideração a relação albumina/globulina (A/G), de modo a obter uma melhor interpretação das alterações proteicas, já que esta relação evidencia as alterações presentes nos 2 principais grupos de proteínas (Eckersall, 2008).

Na presença de uma relação A/G normal, uma situação de hiperproteinémia está associada à presença de uma desidratação, onde há perda do componente líquido do sangue, ocorrendo assim um aumento proporcional em todas as frações proteicas,

incluindo a albumina (Meyer & Harvey, 2004, Eckersall, 2008) Já a presença de uma hipoproteinemia está associada a uma sobrehidratação ou à perda aguda de sangue ou plasma, ocorrendo uma diminuição tanto da albumina como das globulinas (Meyer & Harvey, 2004). Uma diminuição ou um aumento na relação A/G é indicativo da presença de um perfil eletroforético alterado pelo que esta relação deverá ser sempre analisada em conjunto com as outras alterações presentes (Thomas, 2000; Eckersall, 2008).

Devido ao seu tamanho reduzido a albumina é facilmente perdida na presença de doenças renais, gastrointestinais e parasitismo intestinal (Eckersall, 2008). A presença de uma relação A/G normal com hipoalbuminemia está associada a condições clínicas como uma perda aguda de sangue, dermatite exsudativa grave, enteropatia ou sobrehidratação (Meyer & Harvey, 2004). Já uma hipoalbuminemia com uma relação A/G diminuída é indicativa de situações onde existe diminuição da produção, perda seletiva ou mesmo um sequestro de albumina para as cavidades corporais (Thomas, 2000) A diminuição da produção ocorre em condições de insuficiência hepática, má nutrição, síndrome de má absorção, insuficiência pancreática exócrina, numa resposta inflamatória; enquanto que a perda seletiva ocorre principalmente na presença de nefropatias, mais propriamente em glomerulonefrites, onde a existência de membranas glomerulares lesadas permite a passagem das moléculas de albumina para o meio extravascular (Meyer & Harvey, 2004; Thomas, 2000) .

Um aumento na concentração das α -globulinas ocorre secundariamente a uma lesão tecidual ou na presença de uma inflamação como parte de uma resposta de fase aguda (Thomas, 2000). Uma vez que uma grande maioria das PFA migra nas regiões α_1 e α_2 , um aumento destas frações é normalmente associado a doenças inflamatórias agudas e crônicas (Eckersall, 2008). Estas proteínas ajudam a regular a resposta inflamatória e a remover os produtos produzidos por células alteradas. Um aumento destas globulinas não ocorre apenas na presença de inflamações, mas também após a administração de corticosteróides, o que se deve a um aumento da haptoglobina, sensível aos mesmos (Martinez-Subiela & Céron, 2005). Uma diminuição na concentração destas globulinas, nos cães, está associada à presença de uma cirrose hepática (Thomas, 2000).

Um aumento isolado da concentração das β -globulinas raramente acontece e quando tal se verifica está frequentemente associado à presença de uma doença hepática ativa devido ao aumento da transferrina ou à dermatite supurativa, a qual também estimula o aumento da fração β , devido à estimulação antigénica da IgM e do complemento. De um modo geral, o aumento das β -globulinas ocorre em associação ou com o aumento das α -globulinas, (como parte da resposta de fase aguda) ou com o

aumento das γ -globulinas (como parte da resposta à inflamação crônica ou infecção) (Thomas, 2000). A maioria dos aumentos nas β -globulinas são policlonais com um aumento simultâneo das γ -globulinas, podendo ocorrer ocasionalmente um aumento monoclonal, geralmente encontrado em pacientes com mieloma múltiplo (Eckersall, 2008).

Por último, o aumento das globulinas pode estar relacionado com o aumento da fração γ , que contém a maioria das imunoglobulinas. Este aumento designa-se de gamapatia, a qual pode ser classificada em policlonal e monoclonal, com base na largura do pico da região γ , após realização do traçado eletroforético (Meyer & Harvey, 2004).

A gamapatia policlonal é caracterizada por um aumento amplo das γ -globulinas sendo resultado de um aumento da produção de variados tipos de imunoglobulinas, por múltiplos clones de plasmócitos e linfócitos B (Figura 8) (Thomas, 2000; Eckersall, 2008). Estes aumentos policlonais estão associados a uma resposta imunitária ativa, ocorrendo em situações de inflamação, infecções crônicas (de origem bacteriana, fúngica, viral e parasitária), neoplasias e doenças imunomediadas (Thomas, 2000). As gamopatias monoclonais são caracterizadas pelo aparecimento de uma base estreita na região γ (semelhante ao pico da albumina) no traçado eletroforético, como resultado da produção de imunoglobulinas induzida por um único clone de linfócitos B e plasmócitos (Figura 9) (Meyer & Harvey, 2004). Assim, ocorre a produção de uma única classe de imunoglobulinas, como resultado da produção de um único clone plasmocitário. Normalmente, no cão e no gato, as imunoglobulinas mais frequentemente associadas a condições de malignidade são a IgG e a IgA (Eckersall, 2008). As gamopatias monoclonais estão associadas maioritariamente a doenças linfoproliferativas como o linfoma e o mieloma múltiplo, mas também podem associar-se a infecções crônicas como a Leishmaniose (embora seja menos comum) (Meyer & Harvey, 2004; Antognoni *et al.*, 2010).

A presença de uma relação A/G aumentada pressupõe um aumento da concentração da albumina ou uma diminuição nos níveis das globulinas, contudo este aumento da albumina não é real e não acontece nos animais. Normalmente ela é o resultado de uma hemoconcentração, devido a uma perda de água excessiva e uma desidratação (Eckersall, 2008). Já o decréscimo na concentração das globulinas está associado a síndromes de imunodeficiência imunitária, ou a situações de falha na transmissão passiva do colostro em neonatos, caracterizando-se por uma diminuição das γ -globulinas (Eckersall, 2008). Estas últimas podem ainda encontrar-se diminuídas na presença de perdas agudas de sangue ou nas enteropatias com perda de proteína, ocorrendo também uma diminuição dos níveis de albumina (Thomas, 2000).

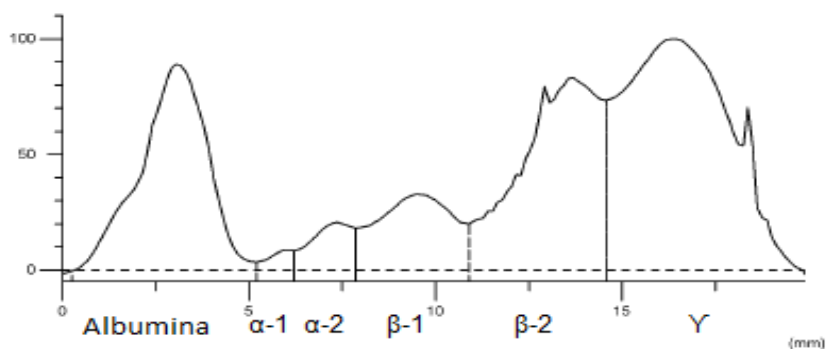


Figura 8. Traçado eletroforético de um animal com leishmaniose onde é possível observar uma gamapatia policlonal da região β e γ (Fotografia original).

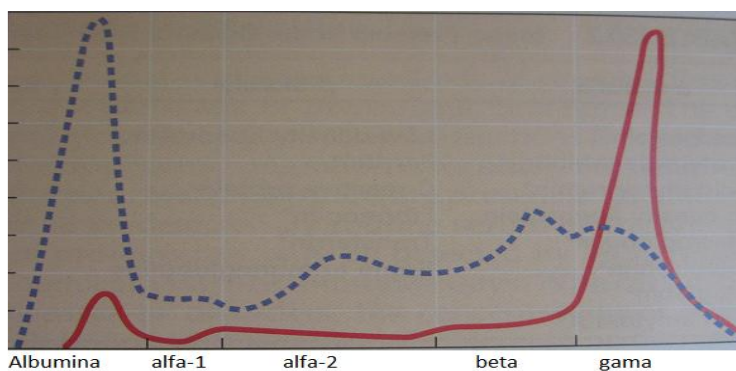


Figura 9. Traçado eletroforético característico de um cão com mieloma múltiplo (linha vermelha) em comparação com um traçado eletroforético normal (linha tracejada). Nesta imagem é possível verificar a existência de um pico monoclonal da região γ . (Adaptado de Thomas, 2000)

14. Eletroforese de Proteínas Séricas na Leishmaniose Canina

A realização de um proteinograma tem vindo a ser sugerida como meio de diagnóstico auxiliar de Leishmaniose Canina, uma vez que as alterações encontradas no proteinograma de indivíduos infetados são sugestivas da presença da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Noli, 1999).

A monitorização do tratamento constitui um problema importante uma vez que os protocolos utilizados raramente alcançam a cura clínica e a presença de recidivas é frequente, sendo por isso necessária uma série de ciclos de tratamento. Assim, um potencial método de monitorização da eficácia terapêutica pode ser a realização de

uma eletroforese das proteínas séricas, esperando-se uma normalização dos valores obtidos antes do tratamento. O parâmetro mais frequentemente utilizado para avaliação da resposta à terapia é a relação A/G e o estudo das frações proteicas cuja normalização indicam uma boa resposta à terapêutica. Contudo, nem todos os doentes infetados apresentam modificações nas frações proteicas e em alguns casos é mesmo possível verificar a presença de um proteinograma alterado em casos onde o tratamento foi bem-sucedido (Noli, 1999; Martínez-Subiela & Céron, 2005).

As alterações encontradas mais frequentemente nas proteínas séricas de animais infetados com leishmaniose traduzem-se por uma hiperproteinémia associada a uma hiperglobulinémia e a uma hipoalbuminémia resultando na diminuição da relação A/G (Figura 10) (Greene, 2006).

O aumento das proteínas totais, devido sobretudo à presença de hiperglobulinémia, é um achado comum em doentes infetados com leishmaniose podendo este aumento ser considerável e está dependente do grau da diminuição da albumina (Vita *et al.*, 2006).

Um estudo publicado em 2011 utilizando 19 animais infetados demonstrou que 63,2% dos mesmos apresentavam uma diminuição da concentração sérica da albumina (Silva *et al.*, 2011). A hipoalbuminémia presente, é normalmente o resultado do carácter crónico da doença (uma vez que a albumina é uma PFA negativa), lesão renal (glomerulonefrite), insuficiência hepática e diminuição da ingestão de alimento (Noli, 1999; Céron *et al.*, 2005).

Outros estudos reportaram a existência de um aumento da concentração das PFA em animais infetados com leishmaniose, nomeadamente a haptoglobina, a Proteína-C-Reativa e a ceruloplasmina permitindo afirmar que existe uma resposta de fase aguda em indivíduos infetados, verificando-se um aumento das frações α e β em 36,0% dos indivíduos infetados (Sasanelli *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011).

A presença de hiperglobulinémia está normalmente associada a uma hiperglobulinémia β e/ou γ , devido à ativação policlonal das células B, o que resulta num aumento da fração β , γ ou de ambas. Numa fase inicial da infeção, há um aumento progressivo de β -globulinas seguida de um aumento de γ -globulinas, numa fase mais tardia (Noli, 1999). Poderá, ainda que raramente, ocorrer a proliferação de apenas um único clone de plasmócitos resultando na presença de gamapatias monoclonais em cães infectados com leishmaniose (Thomas, 2000).

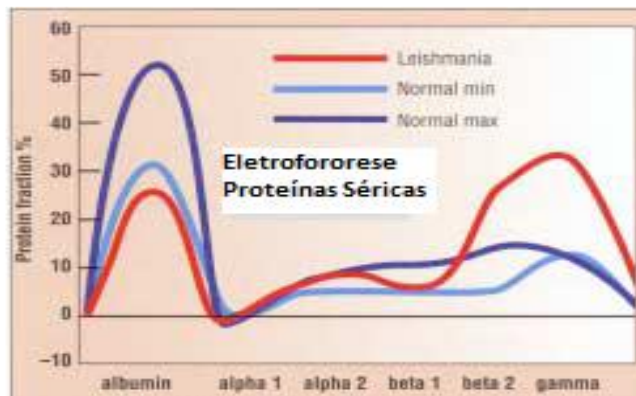


Figura 10. Perfil eletroforético característico de um cão com Leishmaniose Canina (linha vermelha) em comparação com um perfil eletroforético de um cão saudável (linhas azuis). (Adaptado de Noli, 1999)

A normalização dos valores do proteinograma sérico é um bom indicador da eficácia terapêutica no doente, contudo, para que a mesma ocorra pode ser necessário um longo período de tempo (Noli, 1999; Solano-Gallego, 2009). Um estudo publicado em 2007, revela que 19 animais naturalmente infetados com leishmaniose canina foram monitorizados durante o tratamento a longo prazo com alopurinol. Em todos os animais, a remissão dos sinais clínicos foi observada dois meses após o início do tratamento, tendo sido possível observar um decréscimo na concentração das proteínas totais, assim como um aumento na concentração da albumina sérica e um aumento na relação A/G. A diminuição das γ -globulinas para valores considerados normais ocorreu apenas ao fim de 6 meses após o tratamento (Sasanelli *et al.*, 2007). Martinez-Subiela & Ceron apresentaram em 2005 um estudo onde animais submetidos a um tratamento a curto prazo com antimonio de meglumina em associação com alopurinol, apresentaram uma inversão da relação A/G verificando-se um ligeiro aumento (não significativo) desta relação, sugerindo pois que esta relação deve ser usada com precaução para avaliação da resposta inicial à terapêutica. Foram calculados dois diferentes tipos de rácios utilizando uma ou duas PFA em conjunto, nomeadamente a proteína-C-reativa, a Proteína Amilóide A sérica, a ceruloplasmina, a haptoglobina e uma PFA negativa, a albumina. Neste estudo chegou-se à conclusão que a utilização do rácio utilizando a proteína-C-reativa e a ceruloplasmina em conjunto com a albumina apresentou uma grande percentagem de diminuição (78,0%) podendo tornar-se útil na avaliação da resposta inicial ao tratamento uma vez que a concentração das mesmas diminuiu significativamente quando o tratamento é bem sucedido podendo funcionar assim como biomarcadores para a monitorização da resposta ao tratamento (Martinez-Subiela & Ceron., 2005).

II - ESTUDO DAS PRINCIPAIS ALTERAÇÕES NO PROTEINOGRAMA DE CANÍDEOS COM LEISHMANIOSE ANTES E APÓS TRATAMENTO

1. Objetivos

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar as alterações presentes no proteinograma em pacientes com Leishmaniose diagnosticada e perceber o modo da sua evolução em 3 momentos de estudo diferentes: M0 (diagnóstico); M1 (30 dias após início de terapêutica) e M2 (120 dias após início da terapêutica). Como objetivos específicos pretendeu-se:

- Comparar a titulação de anticorpos anti-leishmania em M0 e M2 e verificar a sua utilidade como método de monitorização terapêutica num tratamento a curto-prazo;
- Verificar a utilidade do proteinograma como método complementar de diagnóstico em canídeos com leishmaniose diagnosticada;
- Verificar a utilidade do proteinograma como método de monitorização terapêutica eficaz a curto-prazo em canídeos com leishmaniose diagnosticada.

2. Material e métodos

O presente estudo foi desenvolvido no Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis (CMVAA), no período de Setembro de 2011 a Março de 2012, e utilizou uma amostra de 14 pacientes da espécie *Canis familiaris* (n=14) com leishmaniose. O diagnóstico foi realizado com base na anamnese, quadro clínico, hemograma e análises bioquímicas, serologia qualitativa com técnica de imunocromatografia rápida. Foi também requisitado a titulação de anticorpos através da técnica de IFI e proteinogramas, ambas as técnicas realizadas em laboratório certificado. Todos os pacientes foram sujeitos a um protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina na dose de 50 mg/kg de 12 em 12 horas (BID) via subcutânea (SC) em associação com alopurinol (10 mg/kg/BID) *per os* (PO) durante as primeiras 4 semanas e nos meses seguintes apenas com alopurinol. Foram realizadas colheitas de amostras de sangue para a realização de de proteinogramas nos 3 momentos considerados M0, M1 e M2 a

fim de avaliar a sua evolução e a quantificação da titulação de anticorpos em M0 e M2. Foram incluídos no estudo todos os doentes que apresentaram uma titulação igual ou superior a 1/80 e que tenham realizado no mínimo 3 proteinogramas, nomeadamente nos momentos considerados M0, M1 e M2 e que tenham realizado a titulação de anticorpos anti-leishmania em M0 e M2. Foram excluídos todos os doentes cuja titulação de anticorpos fosse inferior a 1/80 ou que não tenham realizado os proteinogramas em M0, M1 e M2 e a titulação de anticorpos anti-leishmania em M0 e M2; ou que apresentaram simultaneamente doenças concomitantes. A análise estatística dos dados considerando um nível de significância de 5%, ou seja, para valores $<0,05$ os resultados foram considerados significativos, foi realizada com a utilização dos programas Microsoft Office Excel ® 2007 e SPSS Statistics versão 17.0 ®. Além da estatística descritiva (média, desvio padrão, mínimo e máximo), foi realizada a estatística inferencial, utilizando o teste não paramétrico de Friedman e o teste de Wilcoxon com o teste post-hoc de Bonferroni.

3. Resultados

Caracterização da amostra em estudo

A amostra em estudo era constituída por 9 animais machos (64,3%), e 5 fêmeas (35,7%) (Figura 11).

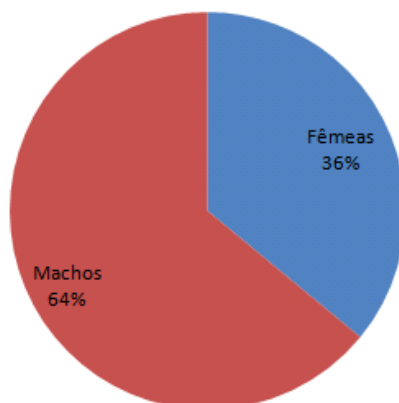


Figura 11. Frequência relativa do género dos pacientes pertencentes à amostra.

Relativamente à **idade**, a idade média dos pacientes em estudo era de $7,1 \pm 3,3$ anos (idade mínima de 2 anos e máxima de 11 anos). A idade da maioria dos pacientes, ou seja 7 dos 14 pacientes (50%), estava compreendida entre os 4 e 8 anos, 5 dos 14 pacientes (35,7%) tinham uma idade igual ou superior a 9 anos e finalmente 2 pacientes (14,2%) tinham idade igual ou inferior a 3 anos (Figura 12).

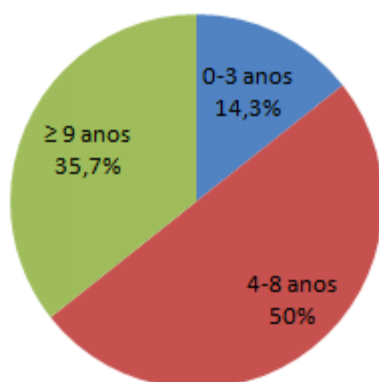


Figura 12. Distribuição de pacientes por classes de idade.

Quanto à **raça**, 7 dos 14 pacientes neste estudo (50%) foram classificados como sendo de raça indeterminada. Os restantes 7 pacientes (50%) eram de raça pura, 2

deles (14,3%) pertencentes à raça Pitt Bull e 2 pertencentes à raça Boxer (14,3%). Por fim um paciente pertencente à raça Labrador Retriever (7,1%), um paciente pertencente à raça Pastor Alemão (7,1%) e um paciente pertencente à raça Spitzz (7,1%) (Figura 13).

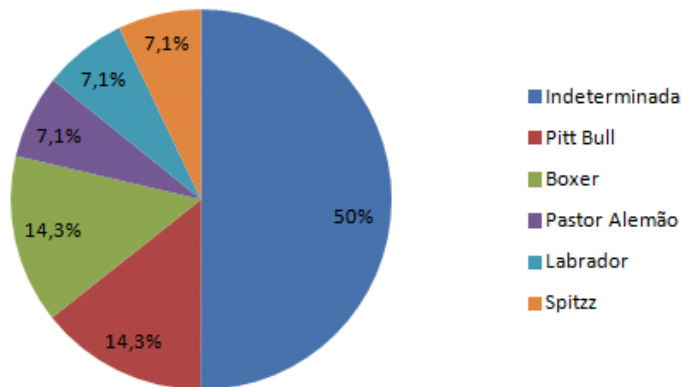


Figura 13. Frequência relativa das raças dos pacientes presentes na amostra.

A maioria dos pacientes, ou seja 10 dos 14 pacientes (71,4%) apresentavam alterações dermatológicas; 7 apresentavam-se com perda de peso (50%); 6 (42,9%) apresentavam alterações gastrointestinais; 5 (35,7%) apresentavam prostração ou letargia; 5 apresentavam poliúria e polidipsia (PU/PD) (35,7%); 4 (28,6%) apresentavam alterações oftalmológicas; 4 (28,6%) atrofia muscular e por fim 3 dos 14 pacientes (21,4%) apresentavam onicogrifose (Figura 14).

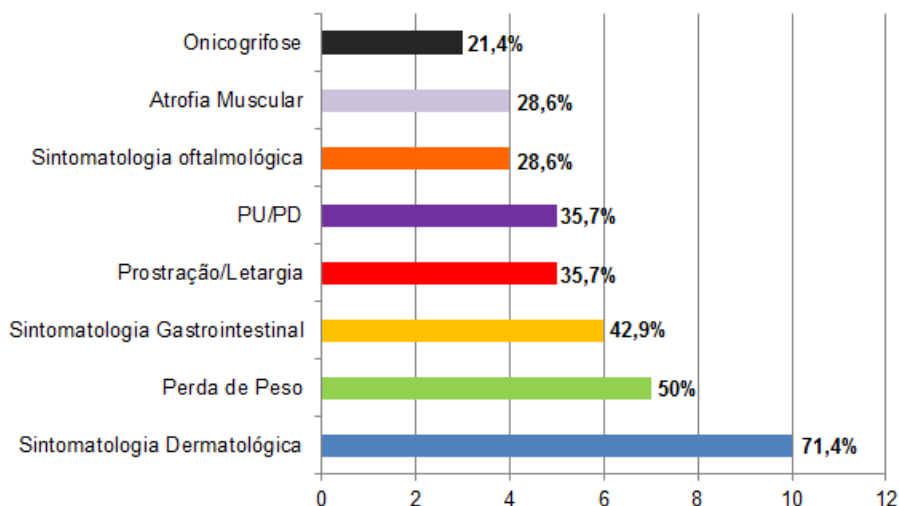


Figura 14. Frequência absoluta e relativa dos sinais clínicos presentes nos pacientes pertencentes à amostra.

Avaliação titulação anticorpos anti-Leishmania: diagnóstico etiológico e avaliação pós-terapêutica

Quanto à análise serológica, utilizando a técnica de Imunofluorescência Indirecta (IFI), foi possível verificar que em M0, ou seja no momento do diagnóstico, 2 dos 14 pacientes (14,3%) apresentavam reatividade serológica com uma titulação de 1/320, 3 (21,4%) apresentavam reatividade para uma titulação de 1/240, 8 (57,1%) apresentavam reatividade com títulos de 1/160 e por fim apenas 1 dos 14 pacientes (7,1%) apresentou reatividade com uma titulação de 1/80 (Figura 15).

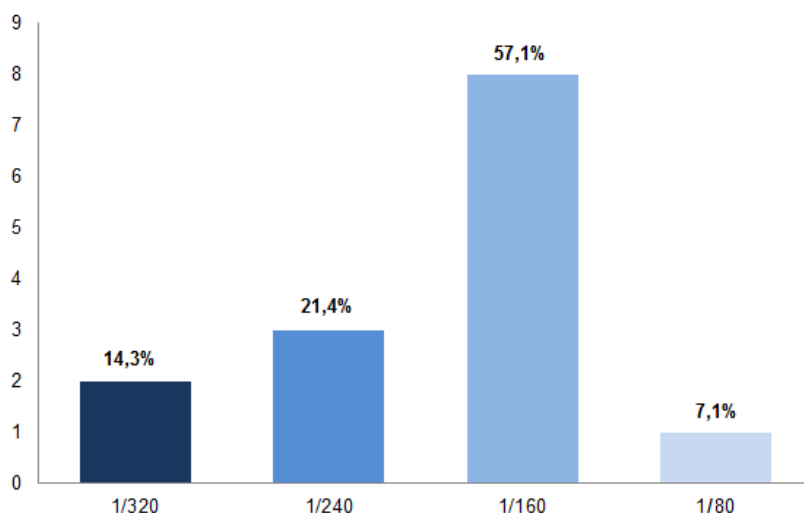


Figura 15. Frequência absoluta e relativa da titulação de anticorpos dos pacientes em M0.

Em M2, 2 dos 14 pacientes (14,3%) apresentavam reatividade com uma titulação de 1/320, 2 pacientes (14,3%) apresentavam reatividade com uma titulação de 1/240, 9 (64,3%) apresentavam reatividade com uma titulação de 1/160 e apenas 1 dos 14 pacientes (7,1%) apresentava reatividade com uma titulação de 1/80 (Figura 16)

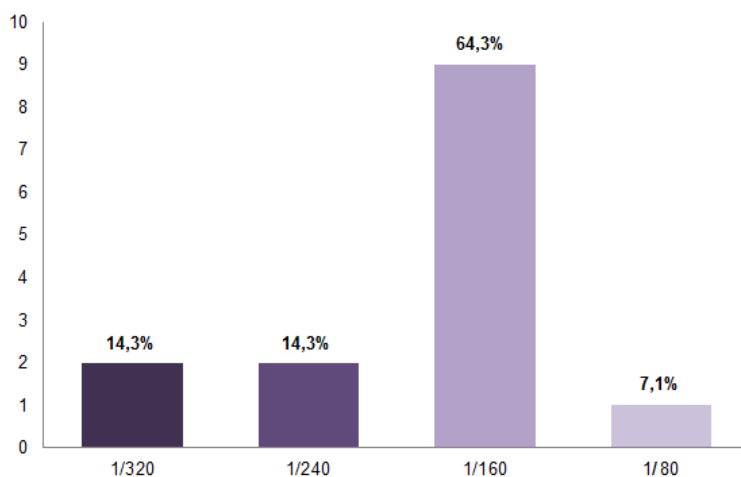


Figura 16. Frequência absoluta e relativa da titulação de anticorpos dos pacientes em M2.

Após terapêutica (M2) verificou-se que a maioria, 11 dos 14 pacientes (78,6%) apresentavam reatividade com a mesma titulação de anticorpos que a encontrada no momento de diagnóstico (M0). Dois pacientes (14,3%) revelaram uma diminuição dos títulos para os quais se mostraram serorreativos, apresentando um dos pacientes em M0 uma titulação de 1/240 e em M2 uma titulação de 1/160 e o outro uma titulação de 1/160 em M0 e 1/80 em M2. Apenas 1 dos 14 pacientes (7,1%) apresentou um aumento da titulação para a qual apresentava reatividade, apresentando-se em M0 com 1/80 e em M2 com 1/160 (Figura 17).

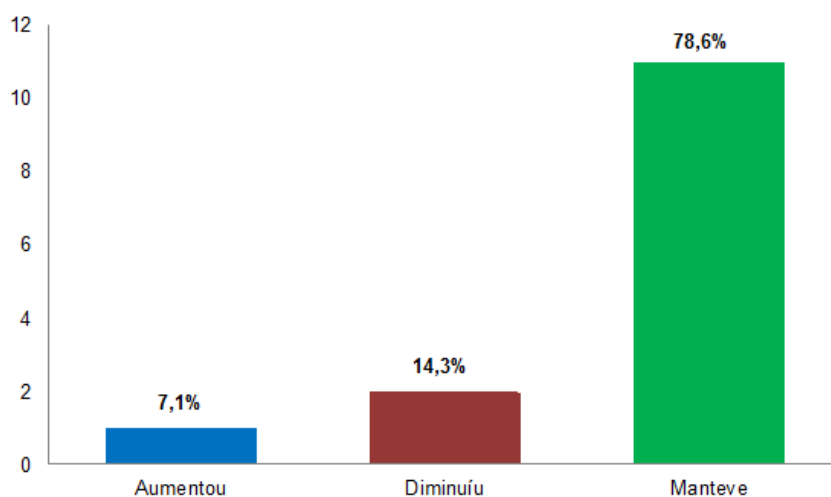


Figura 17. Frequência relativa e absoluta dos pacientes que aumentaram, diminuíram ou mantiveram a mesma titulação de anticorpos em M2 comparativamente a M0.

Alterações do proteinograma dos pacientes no momento do diagnóstico

Parâmetro	g/dL	Referência
Proteínas totais	8,62±1,35	[5,5-7,5]
Relação A/G	0,50±0,21	[0,6-1,1]
Albumina	2,74± 0,85	[2,26 – 4.31]
α1-globulina	0,54±0,36	[0,32-0,75]
α2-globulina	1,38±0,49	[0,5-1,17]
β-globulina	2,14±0,63	[0,93-2]
γ-globulina	1,82±0,76	[0,39-1,02]

Tabela 3. Valores médios de proteínas séricas de 14 pacientes portadores de leishmaniose no momento do diagnóstico (M0).

Em M0 os pacientes apresentaram um valor médio das concentrações séricas das Proteínas Totais (PTs) de 8,62 g/dL, (min de 5,5 g/dL e um máx de 10,51 g/dL). Quanto à relação albumina/globulina (A/G), o valor médio encontrado para esta relação foi 0,50 (min de 0,2 e um máx de 1). No que diz respeito à albumina o valor médio das concentrações séricas em M0 era de 2,74 g/dL (min de 1,42 g/dL e um max de 4 g/dL). A fração α 1- globulina e fração α 2 – globulina apresentaram um valor médio das concentrações séricas de 0,54 g/dL (min de 0,1 g/dL e máx de 1g/dL) e 1,38 g/dL (min de 0,8 g/dL e um máx de 2,3 g/dL) respectivamente. Relativamente à fração β -globulina os pacientes apresentaram um valor médio das concentrações séricas de 2,14 g/dL (min de 1 g/dl e um máx de 3,3 g/dL) enquanto que a fração γ -globulina apresentou um valor médio das concentrações séricas de 1,8 g/dL (min de 1,1 g/dL e um máx de 4 g/dL) (Tabela 3).

Percentagem de pacientes com alterações ao nível das frações proteicas ao diagnóstico

Verificou-se que em M0, 5 de 14 pacientes (35,7%) apresentaram hipoalbuminémia, 5 de 14 (35,7%) apresentaram hiperglobulinémia- α 1, 9 de 14 (64,2%) hiperglobulinémia- α 2, 8 de 14 (57,1%) hiperglobulinémia- β , 14 de 14 (100%) apresentaram hiperglobulinémia- γ e 11 de 14 (78,5%) apresentaram hiperproteinémia. Relativamente à relação A/G verificou-se que 10 de 14 (71,4%) dos pacientes apresentaram esta relação diminuída.

Alterações do proteinograma dos pacientes 30 dias após instituição da terapêutica

Parâmetro	g/dL	Referência
Proteínas totais	8,10±1,04	[5,5-7,5]
Relação A/G	0,51±0,23	[0,6-1,1]
Albumina	2,66± 0,87	[2,26 – 4.31]
α-1-globulina	0,52±0,29	[0,32-0,75]
α-2-globulina	1,24±0,46	[0,5-1,17]
β-globulina	2,19±0,39	[0,93-2]
γ-globulina	1,42±0,52	[0,39-1,02]

Tabela 4. Valores médios das proteínas séricas de 14 pacientes com leishmaniose em M1.

Em M1 os pacientes apresentaram um valor médio das concentrações séricas de PTs de 8,1 g/dL (min de 6,4g /dL e um máx de 9,7g/dL). Para a relação A/G verificou-se um valor médio de 0,51 (min 0,3 e máx 1,1). A albumina apresentou um valor médio das concentrações séricas de 2,66 g/dL (min de 1,75g/dL e máx de 4,3g/dL). A fração α 1-globulina apresentou um valor médio das concentrações séricas de 0,52 g/dL (min de 0,1g/dL e máx de 0,98 g/dL) enquanto que a fração α 2-globulina apresentou um valor médio das concentrações séricas de 1,24 g/dL, (min de 0,3g /dL e máx de 2,02g /dL). Relativamente à fração β -globulina os pacientes apresentaram um valor médio das concentrações séricas de 2,19 g/dL (min de 1,4g/dL e um máx de 2,6g /dL) e por fim a fração γ -globulina apresentou um valor médio das concentrações séricas de 1,42 g/dL, (min de 0,87g/dL e um máx de 2,8g/dL) (Tabela 4).

Percentagem de pacientes com alterações ao nível das frações proteicas 30 dias após início da terapêutica

Em M1 verificou-se que 6 dos 14 pacientes (42,8%) apresentavam hipoalbuminémia, 6 (42,8%) apresentavam hiperglobulinémia- α 1, 8 (57,1%) apresentavam hiperglobulinémia- α 2, 9 (64,2%) apresentaram hiperglobulinémia- β , 10 (71,4%) hiperglobulinémia- γ e 11 dos 14 pacientes apresentaram (78,5%) hiperproteinémia. Relativamente à relação A/G 9 dos 14 pacientes (64,2%) apresentaram uma relação A/G inferior a 0,5.

Alterações do proteinograma dos pacientes 120 dias após instituição de terapêutica

Parâmetro	g/dL	Referência
Proteínas totais	7,40±1,24	[5,5-7,5]
Relação A/G	0,67±0,22	[0,6-1,1]
Albumina	2,79± 0,5	[2,26 – 4.31]
α1-globulina	0,51±0,23	[0,32-0,75]
α2-globulina	1,04±0,3	[0,5-1,17]
β-globulina	1,94±0,67	[0,93-2]
γ-globulina	1,05±0,55	[0,39-1,02]

Tabela 5. Valores médios das concentrações de proteínas séricas de 14 pacientes com leishmaniose em M2.

Em M2 os pacientes apresentaram um valor médio das concentrações séricas de PTs de 7,4 g/dL (valor min de 6g/dL e máx de 10,5 g/dL) sendo que o valor médio da relação A/G era de 0,67 (min de 0,4 e máx de 1,2). Já a albumina registou um valor médio das concentrações séricas de 2,79 g/dL (min de 2,2 g/dL e máx de 3,8g/dL). A fração α 1-globulina apresentou um valor médio das concentrações séricas de 0,51g/dL (min de 0,2 g/dL e máx de 0,87g/dL) enquanto que a fração α 2-globulina apresentou um valor médio das concentrações séricas de 1,04g/dL (min de 0,5 g/dL e máx de 1,7g/dL). Relativamente à fração β -globulina os pacientes apresentaram um valor médio das concentrações séricas de 1,94 g/dL (min de 1,3 g/dL e máx de 3,99g/dL) enquanto que a fração γ -globulina apresentou um valor médio das concentrações séricas de 1,05 g/dL (min de 0,4 g/dL e máx de 2,69g/dL) (Tabela 5).

Percentagem de pacientes com alterações ao nível das frações proteicas 120 dias após início da terapêutica

Verificou-se que em M2 apenas 2 dos 14 pacientes (14,2%) apresentaram hipoalbuminémia, 3 (21,4%) apresentaram hiperglobulinémia- α 1, 5 (35,7%) apresentaram hiperglobulinémia- α 2 e 4 dos 14 pacientes (28,5%) apresentaram hiperglobulinémia β . Relativamente à fração γ -globulina, 7 dos 14 pacientes (50%) apresentaram hiperglobulinémia- γ e 5 (35,7%) apresentaram um aumento do valor médio das concentrações séricas de PTs. Quanto à relação A/G 5 de 14 dos pacientes (35,7%) apresentaram uma relação A/G inferior a 0,5.

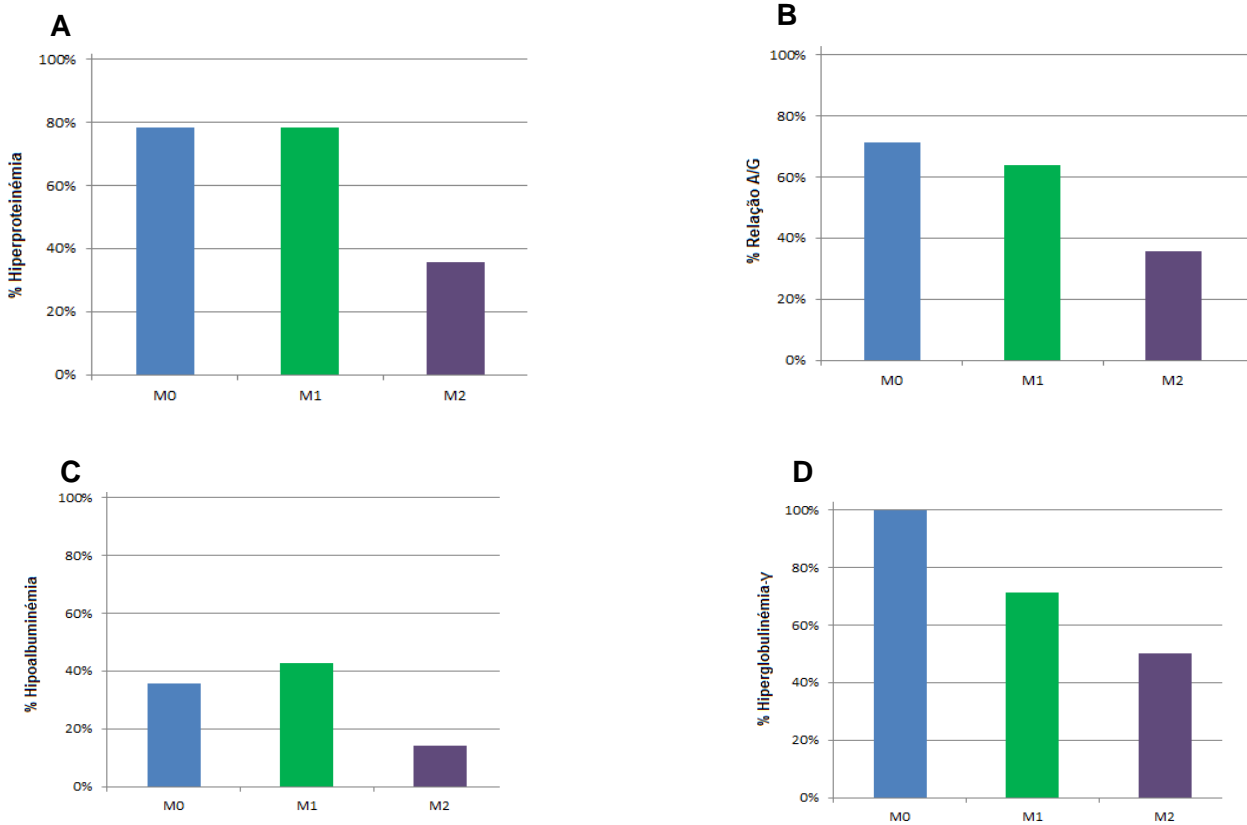


Figura 18. A - Percentagem de pacientes com hiperproteinemia nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2). B - Percentagem de pacientes que apresentaram uma relação A/G diminuída nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2). C - Percentagem de pacientes com hipoalbuminemia nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2). D - Percentagem de pacientes com hiperglobulinemia- γ nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).

Análise da evolução das diferentes frações constituintes do proteinograma nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2)

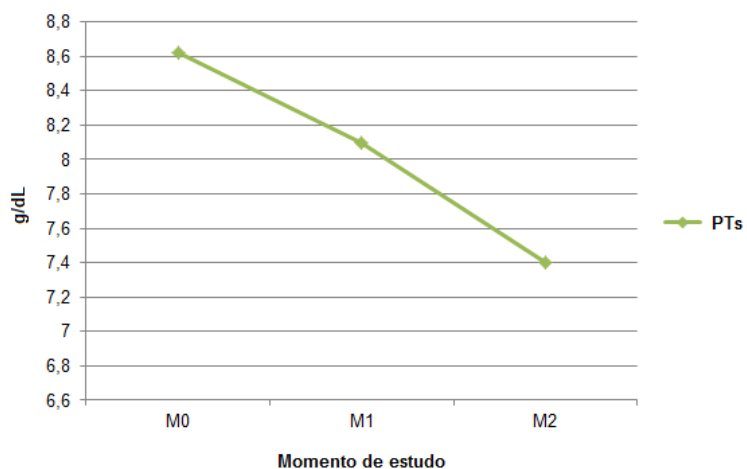


Figura 19. Valor médio do nível sérico das Proteínas Totais nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).

Na avaliação das **PTs** a análise de variância de Friedman sugere a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os 3 tempos ($p=0,00$), com uma diminuição progressiva dos valores médios das concentrações séricas durante os 3 momentos de estudo (Figura 19). O teste de Wilcoxon com o teste post-hoc de Bonferroni aplicado sugere diferenças estatisticamente significativas entre M1 e M2 ($p=0,01$).

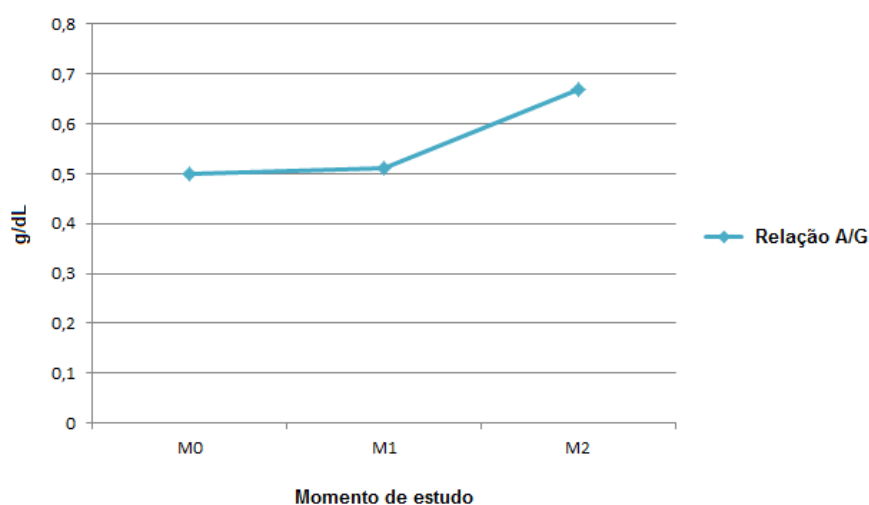


Figura 20. Valor médio da relação A/G nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).

De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar um aumento progressivo dos valores médios relativos à **relação A/G** em M0, M1 e M2, sendo este aumento mais acentuado entre M1 e M2 (Figura 20). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,00$). O teste de Wilcoxon com o teste post-hoc de Bonferroni aplicado sugere que as diferenças estatisticamente significativas foram apenas entre M0 e M2 ($p=0,00$) e M1 e M2 ($p=0,01$).

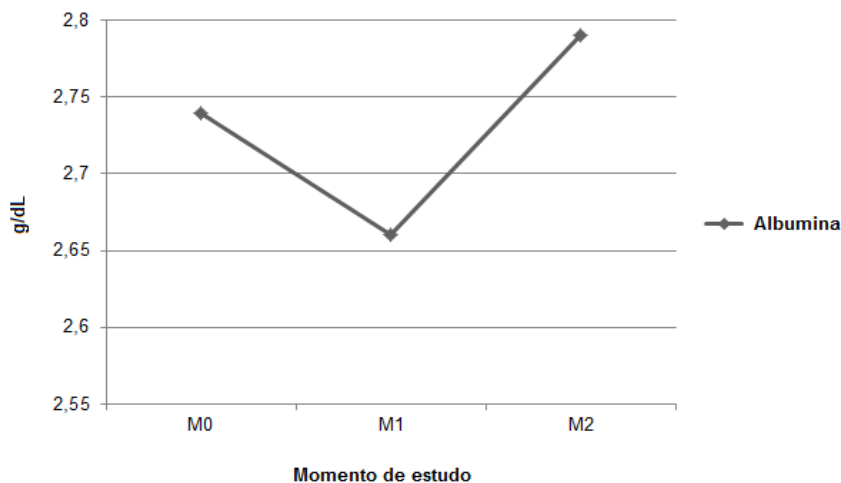


Figura 21. Valor médio das concentrações séricas de albumina nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).

A figura 21 permitiu verificar uma flutuação dos valores médios das concentrações séricas de **albumina**, nos 3 momentos de estudo ocorrendo uma ligeira diminuição de M0 para M1, seguido de um aumento progressivo dos mesmos até M2. Contudo, segundo a análise de variância de Friedman estas alterações não foram estatisticamente significativas ($p=0,39$).

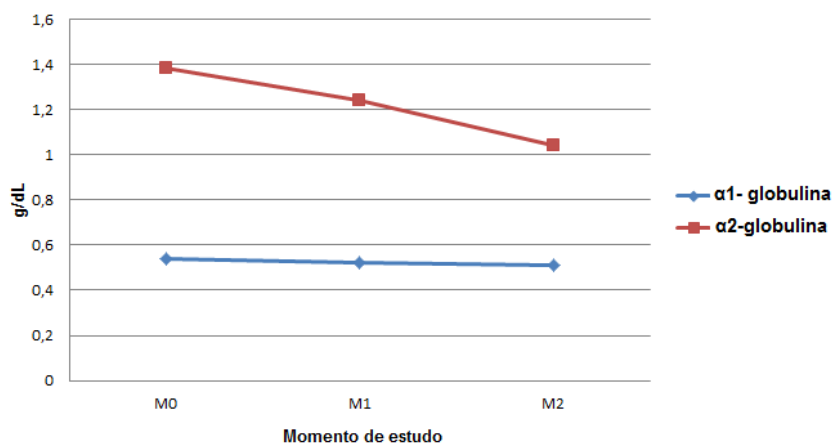


Figura 22. Valor médio das concentrações séricas das frações α1-globulina e α2-globulina nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).

Relativamente à fração **α1-globulina** foi possível observar uma discreta diminuição dos seus valores séricos ao longo dos 3 momentos (M0, M1 e M2) (Figura 22), a qual de acordo com a análise de variância de Friedman não foi estatisticamente significativa ($p=0,53$).

Quanto à fração **α2-globulina** foi possível verificar uma diminuição progressiva dos valores médios das concentrações séricas durante os 3 momentos de estudo (Figura

22), a qual de acordo com a análise de variância de Friedman sugere diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos ($p=0,00$). A realização do teste de Wilcoxon com o teste post-hoc de Bonferroni aplicado sugere diferenças significativas entre os momentos M0 e M2 ($p= 0,01$).

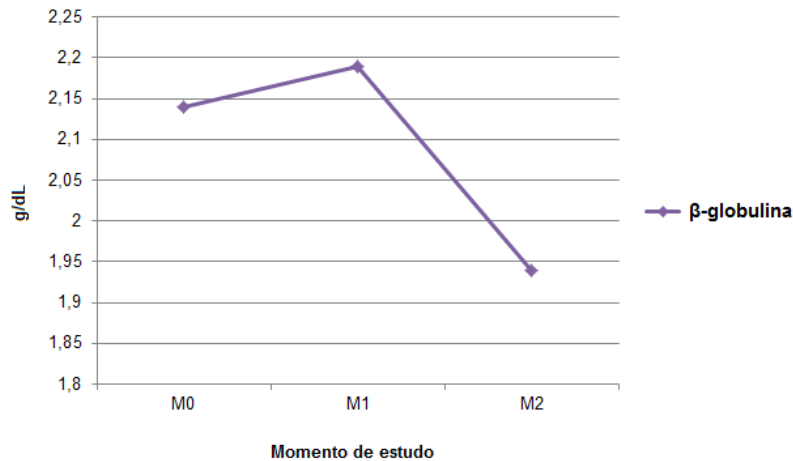


Figura 23. Valor médio da concentrações sérica da fração β -globulina nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).

Para a fração **β -globulina** foi possível verificar uma flutuação dos valores médios das concentrações séricas caracterizados por um aumento dos valores de M0 para M1, seguido de uma diminuição entre M1 e M2 (Figura 23). De acordo com a análise de variância de Friedman as alterações presentes foram estatisticamente significativas ($p =0,01$). O teste de Wilcoxon com o teste post-hoc de Bonferroni aplicado sugere a existência de diferenças estatisticamente apenas entre M1 e M2 ($p=0,01$).

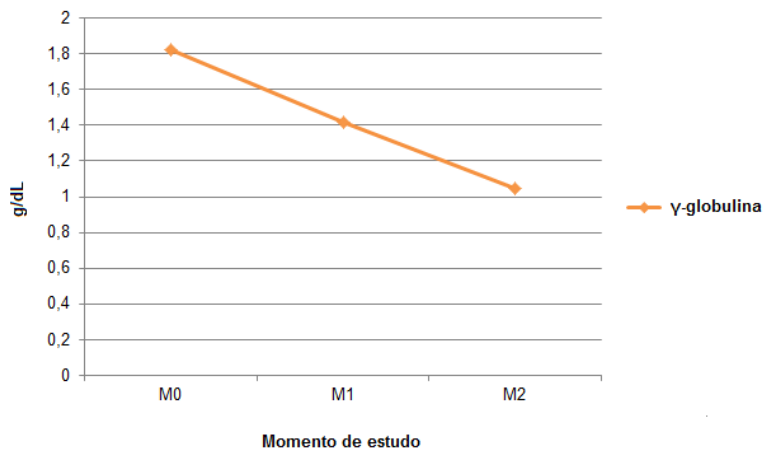


Figura 24. Valor médio das concentrações séricas da fração γ -globulina nos 3 momentos de estudo (M0, M1 e M2).

Quanto à fração **γ -globulina**, foi possível verificar uma diminuição progressiva dos valores médios das concentrações séricas nos 3 momentos de estudo (Figura 24). A análise de variância de Friedman sugere que a diminuição dos níveis séricos médios é significativa ($p=0,00$). Adicionalmente o teste de Wilcoxon com o teste post-hoc de Bonferroni aplicado sugere que as diferenças existem entre M0 e M1, M0 e M2 e M1 e M2 ($p =0,00$ para todos).

4. Discussão

O uso isolado da titulação de anticorpos para a monitorização da resposta à terapêutica permanece controverso. O estudo das diferentes frações proteicas, através da realização do proteinograma, poderá ser um método eficaz na monitorização e avaliação da resposta à terapêutica em indivíduos com Leishmaniose (Martínez-Subiela & Céron, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

No presente estudo, no momento do diagnóstico (M0), a maioria dos indivíduos pertencentes à amostra (57,1%) apresentou uma titulação de 1/160, enquanto que 21,4% apresentou uma titulação de 1/240 e 14,3% uma titulação de 1/320, estes últimos acima do limite superior da positividade. Apenas um doente apresentou uma titulação de 1/80, considerada duvidosa, contudo, a presença de sinais clínicos e de um proteinograma sugestivo da presença da patologia permitiu estabelecer o diagnóstico e iniciar a terapêutica. Foi possível verificar que apesar de se observar uma melhoria clínica no estado geral dos pacientes, a maioria não apresentou alterações na titulação de anticorpos após terapêutica, tornando difícil avaliar a eficácia terapêutica através da utilização isolada deste método serológico. Assim, aos 120 dias após o início da terapêutica, verificou-se que apenas 14,3% dos doentes apresentaram uma diminuição do título de anticorpos, enquanto que 78,6% apresentaram a manutenção da titulação de anticorpos e 7,14% um aumento da mesma. Estes achados corroboram o estudo realizado por Ferrer *et al.* (1995) que afirma que a utilização de métodos serológicos utilizados isoladamente não consiste num método eficaz para a monitorização da eficácia terapêutica em pacientes com Leishmaniose. Por outro lado, como se trata de um estudo realizado num curto período de tempo (120 dias), é possível que possa não ter decorrido tempo suficiente para que se verificasse uma diminuição significativa da titulação dos anticorpos. Está descrita a recomendação da sua repetição 6 meses após o início da terapêutica, devido à semi-vida longa da IgG (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Outros estudos afirmam existir uma diminuição significativa dos níveis de IgG2 em tratamentos a curto-prazo, contudo, neste estudo, apenas foi utilizado o teste serológico IFI não se podendo quantificar os níveis da IgG2, pelo que mais estudos devem ser realizados a fim de verificar a existência de uma diminuição desta imunoglobulina em tratamentos a curto e a longo-prazo, podendo esta última vir a ser um bom indicador da eficácia terapêutica (Vercammen *et al.*, 2002).

Relativamente às alterações do proteinograma dos pacientes no momento do diagnóstico, foi possível verificar diferenças ao nível do perfil eletroforético em todos os pacientes sendo mais frequentemente observada a presença de uma hiperglobulinemia (associada a uma hiperproteinemia e hipoalbuminemia com inversão da relação A/G), estando assim de acordo com o descrito anteriormente por vários autores (Greene, 2006; Solano-Gallego et al, 2009). A hiperproteinemia registada na maioria dos doentes resultou de um aumento do valor médio sérico de PTs estando este aumento diretamente relacionado com a presença de uma hiperglobulinemia (maioritariamente devido a um aumento das γ -globulinas). Relativamente à albumina, foi possível verificar uma diminuição da sua concentração sérica em aproximadamente um terço dos pacientes. Em estudos anteriores foi descrita uma percentagem mais elevada, nomeadamente no estudo realizado por Silva *et al* (2011), em que mais de metade dos doentes apresentaram hipoalbuminemia. Uma vez que alguns animais apresentavam sintomatologia compatível com patologia renal, como PU/PD, perda de peso, prostração; a perda seletiva da albumina poderia estar relacionada com a presença de uma lesão a nível renal (Noli, 1999). Contudo, a perda de albumina pode estar associada também ao carácter crónico da doença, uma vez que a mesma é uma PFA negativa, ou ainda com a presença de alterações a nível hepático que provoquem a diminuição da sua síntese (Noli, 1999; Céron et al., 2005). Embora alguns pacientes apresentassem então uma diminuição da concentração sérica da albumina, o valor médio sérico de albumina no conjunto dos pacientes no momento de diagnóstico encontrou-se dentro dos limites de referência o que se poderá prender com esta reduzida percentagem de pacientes que demonstraram hipoalbuminemia.

A presença da diminuição da relação A/G foi verificada na maioria dos pacientes, com um valor médio próximo do valor encontrado no estudo realizado por Martinez-Subiela & Ceron (2005). A diminuição desta relação é o resultado da presença de uma hiperglobulinemia associada a uma diminuição dos níveis séricos da albumina; contudo nem todos os doentes apresentaram uma diminuição dos níveis séricos desta proteína resultando na presença de relações A/G dentro dos valores de referência, devendo este parâmetro ser usado com alguma precaução no momento do diagnóstico.

A presença de alterações ao nível das frações α 1- e α 2-globulina, onde se encontram a maioria das PFA, foi também um achado frequente com mais de um quarto dos pacientes a apresentar um aumento da fração α 1- e mais de metade deles um aumento da fração α 2-globulina. Estes resultados corroboram o descrito por vários

autores relativamente à existência de uma resposta de fase aguda em cães infetados com Leishmaniose (Sasanelli et al., 2007; Silva et al., 2011). O elevado número de pacientes que apresentaram um aumento na fração α_2 -globulina traduziu-se num aumento do valor médio sérico ficando este acima dos limites de referência. Este poderá estar associado como já foi referido anteriormente a um aumento da produção de PFA (Sasanelli et al., 2007). A presença de um aumento da fração α_1 -globulina em apenas alguns dos pacientes poderá estar relacionado possivelmente com o fato desta fração ser compreendida principalmente pela α_1 -antitripsina. Esta proteína tem um papel preponderante no processo inflamatório agudo pelo que poderá já não estar elevada na maioria dos pacientes nos quais está instalada a cronicidade. Para além disto esta fração é ainda composta pela α_1 -glicoproteína ácida, glicoproteína com carácter anti-inflamatório (Meyer & Harvey, 2004; Eckersall, 2008; Silva et al., 2008). Por outro lado, a presença de um aumento da fração α_2 -globulina em mais de metade dos pacientes poderá estar relacionado com, entre outras, com a presença da ceruloplasmina, vital para o processo de regeneração que se encontra sempre associada a um processo de inflamação crónica (Céron et al., 2005; Martinez-Subiela, 2005). Para além disso, poderá também estar aumentada a haptoglobina, proteína responsável pelo sequestro de ferro diminuindo assim a sua disponibilidade para os agentes patogénicos. Ambas as proteínas foram descritas como estando elevadas em pacientes com Leishmaniose Canina (Martinez-Subiela, 2005; Céron et al., 2005; Sasanelli, 2007).

A hiperglobulinémia reportada esteve também associada a uma hiperglobulinémia- β com mais de 50% dos pacientes do presente estudo a apresentar um aumento desta fração, associado a um nível médio sérico, acima dos limites de referência. Este aumento da fração β poderá estar associado a um aumento de C3, fulcral na formação do complexo de ataque à membrana (MAC) aquando da ativação pela via clássica, alternativa ou da lectina. O sistema do complemento é ativado pela PCR que faz também parte da fração β (Meyer & Harvey, 2004). O aumento presente na fração β – globulina corrobora também o trabalho realizado por Noli (1999), que afirma que numa fase inicial da infeção há um aumento progressivo das β -globulinas, seguida de um aumento das γ -globulinas (Noli, 1999). O aumento da concentração sérica destas globulinas pode ser atribuído a um aumento de imunoglobulinas, já que na presença de um estímulo antigénico as mesmas tanto podem migrar na fração β como na fração γ , surgindo em muitos casos um fenómeno designado por "ponte β - γ " no qual não é possível observar uma separação clara entre estas duas frações (Kaneco, 1997).

Para além da hiperglobulinémia- β , todos os pacientes envolvidos nos presente estudo apresentaram um aumento da fração γ associado a um valor médio sérico de aproximadamente o dobro do limite inferior do intervalo de referência. Assim, a hiperglobulinémia presente neste estudo parece estar intimamente associada a uma hiperglobulinémia- γ . O aumento da fracção de γ -globulinas está associado a uma ativação dos linfócitos B, em resposta à presença do parasita, resultando numa maior produção de imunoglobulinas e consequentemente num aumento da concentração das γ -globulinas (Noli,1999).

Durante o tratamento, ou seja, aos 30 e 120 dias após início da terapêutica, foi possível observar uma diminuição estatisticamente significativa ($p=0,00$) da concentração média sérica das PTs, estando diretamente relacionada com a diminuição das concentrações séricas das globulinas, mais propriamente das γ -globulinas devido à diminuição da resposta imunitária humoral após terapêutica. Os resultados obtidos estão de acordo com os de Sassaneli et al, 2007. A percentagem de pacientes com hiperproteinémia apresentou também uma diminuição aos 30 e 120 dias após início da terapêutica, diminuindo de 78,5% para 35,5% estando, como já foi referido, maioritariamente associado à diminuição da percentagem de pacientes com hiperglobulinémia- γ .

Durante o tratamento verificou-se ainda um aumento estatisticamente significativo na relação A/G ($p=0,00$) durante os 3 momentos de estudo, estando diretamente relacionado com a normalização das concentrações séricas da albumina e das restantes globulinas. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Martinez-Subiela & Ceron, (2005), que observaram um aumento da relação A/G durante o tratamento. De referir contudo que enquanto no presente estudo o aumento da relação A/G foi estatisticamente significativo, no estudo de Martinez-Subiela & Ceron, (2005) tal não se verificou. A diminuição da relação A/G verificada antes do tratamento em 71,4% dos pacientes reverteu para os padrões de normalidade em alguns destes doentes em 30 dias após, diminuindo de 71,4% para 64,2% de pacientes que exibiram uma relação A/G diminuída e posteriormente para 35,7% 120 dias após o início, demonstrando assim uma boa capacidade de resposta ao tratamento pelos mesmos.

Relativamente à albumina, foi possível verificar uma flutuação na concentração sérica média da mesma, ocorrendo uma ligeira diminuição dos níveis médios séricos de M0 para M1, seguida de um aumento também ligeiro de M1 para M2, não apresentando estas alterações valor estatisticamente significativo ($p=0,07$). A diminuição dos níveis médios séricos da albumina de M0 para M1 poderá estar relacionada com a presença

de pacientes com alterações a nível renal, que ao serem submetidos ao tratamento com antimoniato de meglumina (nefrotóxico) continuem com alguma perda de albumina por lesão renal, não sendo possível confirmar este último fato, devendo por isso mais estudos ser realizados neste sentido. Os achados do presente trabalho estão de acordo com os resultados obtidos no estudo realizado por Sassaneli *et al.*, 2007 no qual foi possível verificar também um aumento da concentração da albumina durante o tratamento. Contudo, e ao contrário do estudo realizado por Sassaneli *et al.*, 2007, em que o aumento presente da concentração sérica da albumina foi progressivo, no presente estudo, tal não se verificou, ocorrendo uma flutuação dos níveis médios séricos durante os 3 momentos considerados (M0, M1 e M2). A diminuição dos níveis médios séricos no primeiro mês de tratamento poderá estar associada com o aumento da percentagem de pacientes a apresentar hipoalbuminémia em M1, verificando-se um aumento de 35,7% para 42,8%. Contudo, em M2 a percentagem de pacientes que apresentou hipoalbuminémia diminuiu de 42,8% para 14,2% em M2. Este fato demonstra que uma grande parte dos pacientes do estudo atingiu a normalização dos valores séricos de albumina ao fim de 120 dias após o tratamento, demonstrando assim uma boa resposta à terapêutica num curto período de tempo.

Relativamente à fração α 1-globulina, não se observaram diferenças estatisticamente significativas dos níveis médios séricos durante os 3 momentos de estudo. Quanto à fração α 2, observou-se após instituição de terapêutica uma diminuição estatisticamente significativa na concentração média sérica da fração α 2-globulina, o que poderá estar relacionado com a diminuição de certas PFA durante o tratamento. Este último fato é reforçado pelos resultados obtidos num estudo de Sasanelli *et al.*, 2007, no qual foi possível verificar uma diminuição na haptoglobina durante o tratamento. A diminuição progressiva dos níveis médios séricos da fração α 2-globulina em M0, M1 e M2 esteve acompanhada de uma diminuição da percentagem de pacientes a apresentar hiperglobulinémia- α 2 durante os 3 momentos, diminuindo de 64,2% para 57,1% em M1 e posteriormente para 35,7% em M2 demonstrando que uma grande maioria dos pacientes conseguiu a normalização das concentrações da fração α 2-globulina ao fim de 120 dias de tratamento.

No que diz respeito à fração β , foi possível observar uma flutuação dos níveis médios séricos durante os 3 momentos de estudo, ocorrendo um ligeiro aumento de M0 para M1, seguida de uma diminuição da concentração sérica em M2, apresentando estas alterações valores estatisticamente significativos ($p=0,01$). Apesar do aumento

observado de M0 para M1 ser muito ligeiro este poderá estar relacionado com um aumento da concentração das PFA presentes nesta fração (PCR) em alguns pacientes em M1, levando a um aumento do nível médio sérico. Contudo, tal não pode ser comprovado devendo por isso que mais estudos sejam realizados. Já em M2 foi possível verificar uma diminuição dos níveis médios séricos para valores dentro dos limites de referência, podendo estar relacionado com uma diminuição da concentração de PCR e C3 presentes nesta fração durante este período. Este último fato é reforçado pelos resultados obtidos no estudo realizado por Sasanelli et al, 2007, no qual foi possível verificar uma diminuição da PCR durante o tratamento. Como já referido anteriormente, uma vez que em resposta a um estímulo antigénico as imunoglobulinas tanto podem migrar na região γ como na região β , a diminuição da concentração média sérica desta fração também pode estar associada a uma diminuição na produção da imunoglobulinas, contribuindo deste modo para uma diminuição das β -globulinas. O aumento dos níveis médios séricos das β -globulinas em M1 poderá estar associado com um aumento da percentagem de pacientes com hiperglobulinémia- β , aumentando de 57,1% para 64,2%. Contudo, em M2 foi possível verificar uma diminuição da percentagem de pacientes com hiperglobulinémia- β diminuindo de 64,2% para 28,5% demonstrando que a maioria dos pacientes conseguiu uma normalização das concentrações séricas das β -globulinas, após terapêutica a curto-prazo.

Durante o presente estudo verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa durante os 3 momentos de observação na concentração média sérica das γ -globulinas a qual está associada a uma diminuição da resposta imunitária humoral (não protetora). Estes resultados obtidos estão de acordo com aqueles descritos por Sasanelli et al, 2007. Para além da diminuição da concentração média sérica da fração γ , foi também possível verificar uma diminuição na percentagem de pacientes com hiperglobulinémia- γ durante M0, M1 e M2, diminuindo de 100% para 71,4% em M1 e posteriormente para 50% em M2. Apesar de se verificar uma diminuição dos níveis médios séricos ao longo do estudo nem todos os doentes apresentaram uma normalização da concentração média sérica em M2, com 50% deles a apresentarem valores acima dos limites de referência. Num estudo realizado por Sasanelli et al, (2007), a normalização dos valores da fração γ foi obtida ao fim de 6 meses de tratamento, demonstrando ser necessário um longo período de tempo para que tal ocorra. Assim, a diminuição de 71,4% para 50% de pacientes com hiperglobulinémia

em M2 demonstra uma boa resposta ao tratamento, tendo em conta o curto espaço de tempo desde o início da terapêutica (120 dias).

5. Conclusão

A realização do proteinograma no momento do diagnóstico (M0) permitiu concluir ser um bom método de diagnóstico auxiliar, já que a maioria dos pacientes apresentou alterações sugestivas da patologia ao nível das frações proteicas, nomeadamente a presença de uma hiperglobulinémia (maioritariamente γ e β) associada a uma hiperproteinémia, hipoalbuminémia e a uma inversão da relação A/G.

Verificaram-se resultados estatisticamente significativos com uma diminuição dos níveis médios séricos durante o tratamento das frações α -2 ($p=0,00$), β ($p=0,01$) γ ($p=0,00$) e PT ($p= 0,00$) e um aumento da relação A/G ($p=0,00$), para além de uma diminuição na percentagem de doentes com alterações ao nível das frações proteicas demonstrando assim uma boa resposta ao tratamento instituído. Deste modo pode concluir-se que a realização de proteinogramas consiste num bom método de monitorização terapêutica em curtos períodos de tratamento. Pelo fato de nem todos os doentes conseguirem uma normalização de todas as frações proteicas em M2, é possível colocar a hipótese que embora se verifique uma propensão para a normalização dos valores do proteinograma, alguns indivíduos necessitariam de um período de tempo mais prolongado (>120 dias) para que tal aconteça.

Foi também possível concluir que a utilização isolada dos testes serológicos não representa um método eficaz na monitorização do tratamento a curto-prazo em doentes com Leishmaniose, já que a maioria deles, apesar da melhoria clínica, não apresentou uma diminuição significativa na titulação de anticorpos após terapêutica.

Adicionalmente, a presença de uma percentagem relativamente significativa de indivíduos onde se verificou um aumento dos níveis séricos das frações α 1- e α 2-globulina, permitiu concluir que existe uma resposta inflamatória primordialmente baseada em proteínas de fase aguda nos pacientes infetados com Leishmaniose.

Bibliografia

Aga, E., Katschinski, D.M., Zandbergen, G.V., Laufs, H., Hansen, B., Müller, K., Solbach, W., Laskay, T. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, 169, 898-905.

Antognoni MT, Biretoni F, Miglio A, Lalli P, Porciello F, Mangili Pecci V. Monoclonal gammopathy associated with multiple myeloma and visceral leishmaniasis in the dog: a comparison of two cases. *Vet Res Commun*. 2010 Jun;34 Suppl 1:S97-101

Baneth, G., (2002). A review of the treatment of canine leishmaniasis. Em Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain

Banuls, A., Hide, M. & Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Adv Parasitol*, 64, 1-113.

Barbiéri, C. (2006) Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 28, 329–337

Batamuzi, EK, Kristensen, E., Jansen A.L. (1996) Serum protein electrophoresis: Potencial test for use in geriatric companion animal health programmes. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin*, 501-508

Campillo, M.C., Vazquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez,S.H.,Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romerom H.Q., Varela, M.C. (1999). *Parasitología Veterinaria*. (1ª edição). pp.651-665. Madrid: McGraw-Hill Interamericana

Campino, L., Maia, C. (2010) Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. *Acta Med Port*. 859-864

Camus, M. S., Krimer, P.M., LeRoy, B.E., Almy, F.S. (2010). Evaluation of the Positive Predictive Value of Serum Protein Electrophoresis Beta–Gamma Bridging for Hepatic Disease in Three Domestic Animal Species. *Veterinary Pathology* 47(6) 1064-1070

Cerón, J., Eckersall, P., Martínez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *American Society for Veterinary Clinical Pathology*. Vol. 34. No. 2

Coutinho M., Bueno L., Sterzik A., Fujiwara R., Botelho J., De Maria M., Genaro O., Linardi P. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 128, 149–155

Cortes, S., Afonso, M.A., Alves-Pires, C. & Campino, L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, Vol.13, nº 9, 1431-1432.

Cozzone, A. (2002). Proteins: Fundamental Chemical Properties. *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd.

Cray, C., Zaias, J., Altman, N. H.(2009). Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comparative Medicine*. Vol 59, No 6

Dantas-Torres, F.(2007) The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet. Parasitol.* 149, 139–146

Don, B., Kaysen G. (2004). Serum Albumin: Relationship to Inflammation and Nutrition. *Seminars in Dialysis* —Vol 17, No 6. pp. 432–437

Dorlo, T., Balasegaram, M. Beijnen, J., Vries, P. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67(11):2576-97

Durgut, R., Dalkılıç D., Guzel, M. (2012). Evaluation of the Serum Lipid Profiles in Dogs with Symptomatic Visceral Leishmaniasis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 18 (4): 585-588

Eckersal, P.D. (2008) Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. 6th ed. Burlington: Academic Press, 2008. p. 117-155

Farca, A. M., Miniscalco, B., Badino, P., Odore, R., Monticelli, P., Trisciuglio, A., Ferroglio, E. (2012). Canine leishmaniosis: in vitro efficacy of miltefosina and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. Parasitol Res. 2509–2513

Ferrer, L., Aisa, M.J., Roura, X., Portus M. (1995). Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. Veterinary Record.136(20):514-516.

Ferrer, L. (2002) The pathology of Canine Leishmaniasis. Em Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain

Freitas, E., Melo, M.N., Costa-Val, A.P., Michalick, M.S.M. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137, 159-167.

Gomes, Y.M., Cavalcanti, M.P., Lira, R.A., Abath, F.G.C., Alves, L.C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. The Veterinary Journal, 175, 45-52

Gómez-Ochoa, P., Sabaté, D., Homedes, J., Ferrer, L. (2012). Clinical efficacy of a Leisguard®-based program strategically established for the prevention of canine leishmaniosis in endemic areas with low prevalence. Proceedings of the 73^o Congresso Internazionale Multisala SCIVAC, p. 545

Gómez-Ochoa, P., Castillo, J.A. Gascón, M., Zarate, J.J., Alvarez, F., Couto, C.G. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. The Veterinary Journal 179 259–26

Gradoni, L. (2002). The diagnosis of canine Leishmaniasis. Em Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain

Greene, C.E. (2006). *Infectious diseases of the dog and cat*. (3th edition). pp.685-698. Philadelphia: Saunders Elsevier.

Jain, NC. (1993). *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 349-380

Kaneko, Jiro Jerry; Harvey, John W.; Bruss, Michael L. "Chapter 6. Clinical Veterinary Immunology". *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. London: Academic Press, 2008. pp 168.

Kaneko, J. J. Serum proteins and dysproteinemias. In: Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.117-138

Keren, D. (2003). *Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis*. Edward Arnold (Publishers) Ltd pp.1-108

Killick-Kendrick, R. (2002). The life cycles of *Leishmania* on the sand-fly and the transmission of leishmaniasis by bite, em *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain*

Llinás J, Gómez-Ochoa P, Sabaté D, Homedes J, Ferrer L. (2011). Clinical efficacy of a domperidone-based treatment program for the prevention of canine leishmaniosis. *Proceedings of the 46th AVEPA-SEVC Congress, 2011*.

Marcondes, J., Feitosa, F., Ikeda-Garcia, F., Lima, V., Perri, S, Feitosa, M. (2006). Avaliação do proteinograma sérico de cães com e sem sintomas neurológicos, naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 13, n. 1, p. 20-24

Martínez-Subiela, S., Cerón, J. J. (2005). Evaluation of acute phase protein indexes in dogs with leishmaniasis at diagnosis, during and after short-term treatment. *Vet. Med. – Czech*, 50, 39–46

Meyer, D., Harvey, J. (2004). Evaluation of Plasma Proteins. In *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis*. 3th ed: Saunders, p. 156 -166

Ministério da Saúde (MS). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasília, Brasil, 2007

Miranda, S., Roura, X., Picado, A.; Ferrer L., Ramis, A. (2008) Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Veterinary Science*, 35-38

Miró, G., Gálvez, R., Fraile, C., Descalzo, M., Molina, R. (2011). Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasites & Vectors* 2011, 4:52

Moreno, J., Vouldoukis, I., Martin, V., McGahie, D., Cuisinier, A., Gueguen. Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. (2012). *PLoS Negl Trop Dis* 6(6): e1683. doi:10.1371/journal.pntd.0001683

Naucke, T., Lorentz, S. (2012) First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors* 2012, 5:67

Nieves, E., Rondon, M.(2007) Sobrevivencia del parásito *Leishmania* en el insecto vector: interacciones moleculares. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [online]. vol.27, n.2 ISSN 1315-2556.

Noli, C., Auxilia, S.T. (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology*. 16 213–232

Noli, C. (1999). Canine leishmaniasis. Milan, Italy. Waltham Focus ®. Vol 9 No 2

O'Connell, T., Horita, T.J. Kasravi, B. (2005). Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis. *American Family Physician*. Volume 71, Number 1

ONLeish- Observatório Nacional das Leishmanioses. Acedido em: <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>

Otoni, C. (2010). A infecção por *Leishmania infantum chagasi* altera o metabolismo lipídico do hospedeiro. *Tese de mestrado*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

Palatnik-de-Sousa, C. (2012). Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. Volume 3, Article 69.

Quinnell, R., Courtenay, O., Davidson, S., Garcez, L., Lambson, B., Ramos, P., Shaws, J., Shaw, M., Dye, C. (2001) Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, 122, 253±261

Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Ojeda, A., Quintana, J., Riera, C., Gallego, M., Portus, M., Alberola, J., 2006. Dynamics of Leishmania-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 495–498

Santos, N.S.J, Draibe, S., Kamimura, M., Cuppari, L. (2004). *Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise*. *Rev. Nutr.*, Campinas. 17(3):339-349

Sasanelli, M., Paradies, P., Caprarii, D., Greco, B., Palo, P., Palmisano, D., Carelli, G. (2007). Acute-Phase Proteins in Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum* During and After Long-term Therapy with Allopurinol. *Veterinary Research Communications*, 31. 335–338

Selvapandiyan, A., Dey, R., Gannavaram, S., Lakhali-Naoua, I., Duncan, R., Salotra, P., Nakhasi, H. (2012) Immunity to Visceral Leishmaniasis Using Genetically Defined Live-Attenuated Parasites. *Journal of Tropical Medicine* Volume 2012, Article ID 631460, 12 pages

Sharma U., Singh S. (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45: 255-272.

Silva, R., Lopes, A. Faria, R. (2008). Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais*; 18(2): 116-122

Silva, A., Lima, M., Soto-Blanco, B. (2011). Perfil Hematológico e Eletroforético de Proteínas Séricas em Cães Seropositivos para Leishmaniose Visceral no Estado do Rio Grande do Norte. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.5, n.3, p.300-305

Silva, F. (2007) Patologia e Patogénese da Leishmaniose Visceral Canina. *Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas* V.1, n. 1

Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. (2006). *Indian J Med Res* 123, March 2006, pp 311-330

Soares, M., Moraes, J.,Palmeira, V., Miyazato, L., Moraes, F. (2005). Renal Involvement in Visceral Leishmaniasis Dogs. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* V. 11, n.4, p.579-593

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-18.

Solano-Gallego, L., Miró, G. Koutinas, A.,Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Solano-Gallego et al. *Parasites & Vectors* 2011, 4:86

The Center for Food Security and Public Health (CFSPH), Iowa State University (2009). Leishmaniasis (cutaneous and visceral). Acedido em <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leishmaniasis.pdf>

Thomas, J. S. (2000) Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL J. G.; JAIN,N.C. *Schalm's veterinary hematology*. 5th ed.: Lippincott Williams _ Wilkins, p.891-898.

Vercammen, F., Fernandez-Perez, F., Amo, C., Alunda, J. (2002). Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Tropica* 84 (2002) 175/181

Vita, S., Dalessandri, A., Alfonzetti, T., Britti, D., Boari, A. (2006). Evaluation of Total Proteins and Serum Protein Fractions in Cats Naturally Infected by *Leishmania infantum*—A Preliminary Study. *Veterinary Research Communications*, 30(Suppl. 1) 329–332

Vulpiani, M., Iannetti, L., Paganico, D., Iannino, F., Ferri, N. (2011). Methods of Control of the *Leishmania infantum* Dog Reservoir: State of the Art. *Veterinary Medicine International*, Article ID 215964, 13 pages

Westermeier, R. (2005). *Electrophoresis in Practice*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 9 -34

World Health Organization (WHO), Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. WHO Technical Report Series, No. 949, 2010

Xenoulis, P.G., Steiner, J. M. (2010). Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *The Veterinary Journal* 183 12–21