

Marta Catarina Cerieira Braguez

## **LEISHMANIOSE EM LOBO IBÉRICO – ESTUDO SEROLÓGICO**

### **Trabalho de Projecto**

Mestrado em Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia

Abril, 2014



Marta Catarina Cerieira Braguez

## **LEISHMANIOSE EM LOBO IBÉRICO – ESTUDO SEROLÓGICO**

### **Trabalho de Projecto**

Mestrado em Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia

Trabalho efetuado sob orientação de:

Professor Doutor João Mesquita

Abril, 2014



(O Orientador)

---

(João Mesquita)

(O Co-Orientador)

---

(Fernando Esteves)

"As doutrinas expressas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor"

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, quero agradecer à Ritinha pela ajuda e apoio, que sem ela era impossível a realização deste trabalho, pela rabugice e pela paciência que tem para me aturar! Obrigado por seres uma AMIGA!

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Mesquita, pela confiança e interesse que sempre demonstrou e pela imprescindível ajuda na elaboração da tese.

Ao meu Co-orientador, Dr. Fernando Esteves, por toda a paciência, pela partilha de conhecimentos e pelo apoio constante ao longo desta nossa amizade.

À Professora Doutora Anabela Cordeiro da Silva pela gentileza com que me recebeu no Laboratório da FFUP.

À Dra. Carla Lima pelo auxílio na técnica ELISA.

À Joana, obrigado por seres a minha maninha linda.

À Marla, simplesmente por tudo.

À Dani, pela amizade, apoio e paciência ao longo destes anos.

Ao DI e ao Guga que são os meus príncipes.

**A todos um muito Obrigado. Estão e ficarão para sempre no meu coração.**

## ABREVIATURAS

Ac – Anticorpo

ACHLI – Associação de Conservação do Habitat do Lobo Ibérico

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

Ag – Antigénio

ALP – Fosfatase alcalina

ALT – Alanina amino-transferase

BID – Administração de 12 em 12horas

BUN – Ureia nitrogenada sérica (“blood urea nitrogen”)

C+ – Controlo positivo

C- – Controlo negativo

Cm – Centímetro (s)

cp – Comprimido

CRLI – Centro de Recuperação do Lobo Ibérico

DO – Densidade Ótica

ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbant Assay*

ESP – Proteínas secretadas-excretadas de *Leishmania infantum*

IFI – Imunofluorescência Indireta

Ig – Imunoglobulinas

IgG – Imunoglobulina G

IM – Via de administração intramuscular

IR – Insuficiência Renal

IV – Via de administração intravenosa

Kg – Quilograma

L – Litro

LC – Leishmaniose Canina

M – Mole

mL – Mililitro

ng – Nanograma

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONLeish – Observatório Nacional das Leishmanias

PAAF – Punção Aspirativa de Agulha Fina

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pH – Simétrico do algoritmo da atividade do íon hidrogênio

PO – Via de administração *per-os* (oral)

QA – Quillaja saponaria

ROC – Receiver Operating Characteristic

Sb<sup>3+</sup> – Antimoniais Trivalentes

Sb<sup>5+</sup> – Antimoniais Pentavalentes

SNPRCN – Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza

SC – Via de administração subcutânea

UI – Unidades Internacionais

UICN– *International Union for Conservation of Nature*

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

°C – Graus Celsius

% – Percentagem

μL – Microlitro

## RESUMO

Quando falamos de vida selvagem em Portugal, pensamos logo no Lobo Ibérico (*Canis lupus signatus*), que ao longo das últimas décadas tem vindo a sofrer um notório declínio populacional, apenas contrariado pelas medidas protecionistas entretanto implementadas. A diminuição do número de lobos em Portugal resulta principalmente da perseguição direta a que foram sujeitos e da destruição do seu habitat natural. Outra causa de redução/extinção de pequenas populações locais e fragmentadas de grandes carnívoros em outras partes no mundo tem sido as doenças infecciosas. Sendo monitorização da presença de patologias em animais silvestres fundamental no controle das zoonoses emergentes e na conservação das espécies.

Neste contexto pretendeu-se elaborar um estudo de determinação da ocorrência de Leishmaniose, no Lobo Ibérico. Assim, recolheram-se aleatoriamente 42 amostras de sangue a lobos residentes no Parque Nacional Peneda-Gerês que, posteriormente foram testadas recorrendo-se ao método de ELISA.

Através desta técnica, detetou-se que das 42 amostras testadas apenas uma amostra (2,4%) possuía anticorpos anti-leishmania. Um dos motivos para a obtenção de resultados pouco significativos poderá dever-se ao reduzido leque amostral.

Concluímos, então, que são necessários estudos adicionais para avaliar a importância do Lobo Ibérico na transmissão e propagação da Leishmaniose.

**Palavras-chave:** *Canis lupus signatus; Lobo Ibérico; Leishmaniose; Transmissão; Conservação; Técnica ELISA.*

## ABSTRACT

When we talk about wildlife in Portugal, we immediately think the Iberian Wolf (*Canis lupus signatus*), that over the past decades has been suffering a noticeable decline, only contradicted by the protectionist measures that have been implemented. The decrease in the number of wolves in Portugal is mainly the result of direct persecution that they were undergone and the destruction of their natural habitat. Another cause of the decreasing/extinction of local small and fragmented populations of large carnivores in other parts of the world have been the infectious diseases.

Monitoring the presence of diseases in wild animals is essential for the control of emerging zoonoses and for the conservation of the species.

In this context, we intend to conduct a study to determine the occurrence of leishmaniasis in the Iberian Wolf. We, randomly, collected 42 blood samples of Wolves from the Peneda-Geres National Park and tested them by ELISA method.

The ELISA technique detected that only one sample (2.4%) of the tested wolves had anti-Leishmania antibodies. The failure to detect positive results may have been due to the small sample representativeness.

We conclude that further studies are needed to assess the importance of Iberian wolf in the transmission and spread of leishmaniasis.

**Keyword:** *Canis lupus signatus*; Iberian Wolf; Leishmaniasis; Conservation; ELISA technique.

<b>ÍNDICE GERAL</b>	
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE GERAL.....</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. O LOBO IBÉRICO.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1. DISTRIBUIÇÃO.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2. MORFOLOGIA.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.3. REPRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.4. ESTATUTO DE CONSERVAÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.5. RECUPERAÇÃO/PRESERVAÇÃO DA ESPÉCIE .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. LEISHMANIOSE .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1. ETIOLOGIA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2. TRANSMISSÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.3. CICLO DE VIDA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.4. SINAIS CLÍNICOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.5. DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.6. TRATAMENTO.....</b>	<b>28</b>
<b>3. COMPONENTE PRÁTICA .....</b>	<b>34</b>

<b>3.1.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>

## ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS

<b>Tabela 1.</b> Espécies de <i>Leishmania</i> existentes. ....	12
<b>Tabela 2.</b> Fármacos e combinações farmacológicas utilizadas no tratamento de Leishmaniose. ....	31
<b>Tabela 3.</b> Resultados finais obtidos através da subtração da absorvância do branco à média de cada amostra. ....	37
<b>Quadro 1.</b> Meios de diagnóstico de Leishmaniose mais comuns. ....	22
<b>Figura 1.</b> Evolução da distribuição do Lobo Ibérico em Portugal ao longo do século XX. ....	4
<b>Figura 2.</b> Situação atual do lobo em Portugal .....	5
<b>Figura 3.</b> <i>Canis lupus signatus</i> .....	7
<b>Figura 4.</b> Países com elevado risco de ocorrência da Leishmaniose visceral e cutânea no Mundo.....	11
<b>Figura 5.</b> Mapa da prevalência de infeção por <i>L. infantum</i> em Portugal.....	13
<b>Figura 6.</b> <i>Phlebotomus</i> spp.....	15
<b>Figura 7.</b> Forma Promastigota (A); Forma Amastigota (B). ....	16
<b>Figura 8.</b> Métodos convencionais e não convencionais de transmissão de <i>Leishmania infantum</i> . ....	16
<b>Figura 9.</b> Canídeo com perda de peso extrema, astenia e apatia. ....	17
<b>Figura 10.</b> Alopecia simétrica na região periocular.....	18
<b>Figura 11.</b> Hiperqueratose Nasal.....	19
<b>Figura 12.</b> Onicogribose .....	19

<b>Figura 13.</b> Queratoconjuntivite seca e secreção mucopurulenta.....	20
<b>Figura 14.</b> Leishmania infantum por imunofluorescência indireta.....	25
<b>Figura 15.</b> Placas ELISA de 96 poços.....	26
<b>Figura 16.</b> Teste rápido positivo para leishmaniose canina.....	27
<b>Figura 17.</b> Método ELISA indireto.....	36
<b>Figura 18.</b> Resultados Finais.....	37

## 1. INTRODUÇÃO

Nos dias de hoje, a importância das zoonoses associadas a reservatórios silvestres têm vindo a ganhar crescente importância quer por parte da comunidade científica quer por parte das autoridades de Saúde (Kruse *et al.*, 2004).

A monitorização da presença de patologias em animais silvestres é fundamental para o controlo de zoonoses emergentes, visto estes poderem estar intimamente ligados à (re)emergência de possíveis ameaças. A recolha pormenorizada de informação e a colheita de amostras em animais admitidos nos Centros de Recuperação constituem “armas” importantes para uma melhor compreensão das condições nos habitats naturais das populações de onde são proveniente (Bengis *et al.*, 2004; Del Río *et al.*, 2013).

O aumento da densidade populacional humana, a elevada frequência e facilidade de mobilidade a nível local/internacional, a modificação dos sistemas agrícolas juntamente com as alterações climáticas são os principais fatores apontados para emergência e propagação de inúmeros agentes patogénicos e consequentemente zoonoses (Bengis *et al.*, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2011). A sua transmissão está também associada, maioritariamente à existência de vetores artrópodes que estabelecem a ponte entre o ciclo silvático e o ciclo doméstico da doença, proporcionando, assim, a transmissão dos agentes aos hospedeiros definitivos. A coexistência de vetores e hospedeiros reservatórios em áreas geográficas com características ambientais e faunísticas favoráveis à interação destas mesmas espécies são essenciais para disseminação de zoonoses (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Portugal parece possuir condições geográficas e ambientais favoráveis ao aparecimento de vários vetores responsáveis pela transmissão de vários agentes patogénicos de grande relevância clínica e epidemiológica, como é o caso da Leishmaniose (Cardoso *et al.*, 2004). As condições ideais para a transmissão desta zoonose parecem estar reunidas principalmente na região Norte de Portugal onde se observa um elevado grau de proximidade entre a fauna silvestre, os animais domésticos e a população humana, fazendo assim, com que, a Leishmaniose seja uma zoonose endémica e frequente em Portugal (Cardoso *et al.*, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2011). A Leishmaniose é causada por um protozoário do género *Leishmania* e é potencialmente fatal tanto para humanos como para canídeos, com

os últimos a serem considerados o principal hospedeiro reservatório para a infeção (Solano-Gallego *et al.*, 2011), apresentando-se, assim, como um problema epidemiológico complexo, com crescente importância em Saúde Pública, devido sobretudo ao facto de ser negligenciada quer a sua vigilância quer o seu controlo sanitário (Desjeux, 2004).

É necessário contemplar que a espécie-alvo deste estudo (*Canis lupus signatus*) está classificado como uma espécie Em Perigo de extinção em Portugal, pelo que é de todo o interesse conhecer e monitorizar os principais agentes patogénicos que circulam no seu habitat natural e o impacto que estes podem ter na sua conservação (Queiroz *et al.*, 2005; Satre *et al.*, 2008; Del Río *et al.*, 2013). Neste contexto pretende-se elaborar um estudo de determinação da ocorrência de Leishmaniose no Lobo Ibérico.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. O LOBO IBÉRICO**

#### **2.1.1. DISTRIBUIÇÃO**

Inicialmente (século XX) o Lobo Ibérico distribuía-se por toda a Península Ibérica, excluindo unicamente a faixa litoral mediterrânica, onde previamente se extinguiu. No entanto, em meados do século XX, observou-se uma regressão lenta na sua distribuição geográfica, devido a pressões humanas quer de uma forma direta quer indireta. Apesar de em 1950 a população lupina ainda ocupar a totalidade do território português, a partir dos anos 60 sofreu um rápido declínio (Álvares, 2011). A década seguinte representou um período negro na história do lobo em Portugal pois o acesso generalizado a armas de fogo, a construção de novas redes viárias, a fragmentação/destruição do habitat e a progressiva humanização vieram acentuar ainda mais a redução dos efetivos populacionais portugueses (Nunes, 2000). Adicionando o sucessivo aumento do número de caçadores e o extermínio das suas presas selvagens (veado e corço), que se deram nas épocas seguintes, às pressões previamente existente obteve-se, assim uma espécie lupina à beira da extinção nos anos 80 (Nunes, 2000).

A situação manteve-se até meados da década de 80, altura em que Portugal ratificou a Convenção de Berna passando, assim, o lobo a gozar do estatuto de proteção total em 1988, através de uma lei nacional: Lei de Proteção do Lobo Ibérico. No entanto, a Lei foi aprovada apenas em 1990. Embora negligenciando alguns aspetos importantes, o diploma veio regulamentar a proteção da espécie, estabelecendo as disposições para a sua preservação efetiva. De entre essas disposições, figuram aquelas que responsabilizam diretamente o Estado Português:

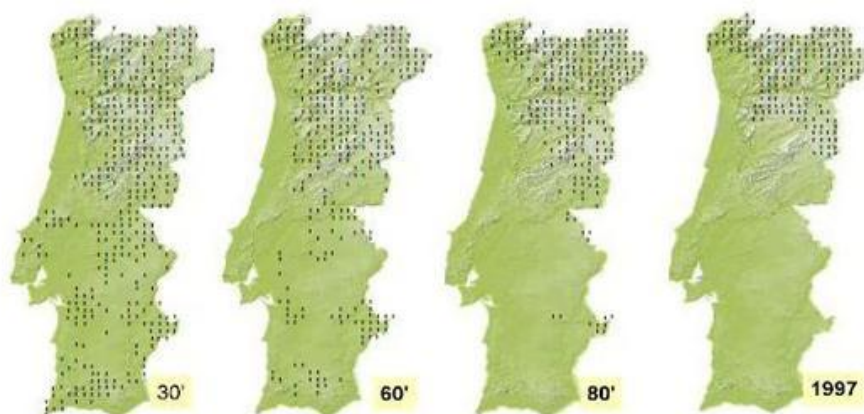
- Adotar uma política de ordenamento do território que não desfigure os habitats da espécie e possibilite a recuperação, onde ela for possível, nomeadamente pela reintrodução de presas naturais do lobo;

- Promover ações de sensibilização de opinião pública com vista à erradicação de infundados temores e à modificação de atitudes e comportamentos;

- Indemnizar os cidadãos que venham a ser considerados como diretamente prejudicados pela ação do lobo, prevendo-se mesmo um prazo máximo de 60 dias após a apresentação da queixa para se efetuar o pagamento;

- Dotar as entidades responsáveis pela Lei de Proteção do Lobo Ibérico dos meios necessários ao cabal cumprimento da sua missão (Decreto-Lei nº 139/90 de 27 de Abril, DR nº97 – I Série; Lei de Protecção do Lobo Ibérico, Lei nº90/88 de 13 de Agosto, DR. nº187 – I Serie)

Embora a legislação tenha significado o fim de uma era durante a qual a espécie atingiu o limiar da extinção (Figura 1), a realidade é que a aplicação prática das medidas preconizadas pelos diplomas legais se mostrou difícil, morosa e em muitos casos, conflituosa. Sendo o pagamento de indemnizações o aspeto mais visível da política nacional de conservação do lobo, a morosidade do processo, recheado de entraves burocráticos, carência de verbas específicas e falta de meios humanos, despoletou o atraso ou mesmo ausência do pagamento das indemnizações, e conseqüentemente o desejo perverso por parte dos lesados que revoltados tentam prejudicar a espécie por meios ilícitos (Moreira, 1998).

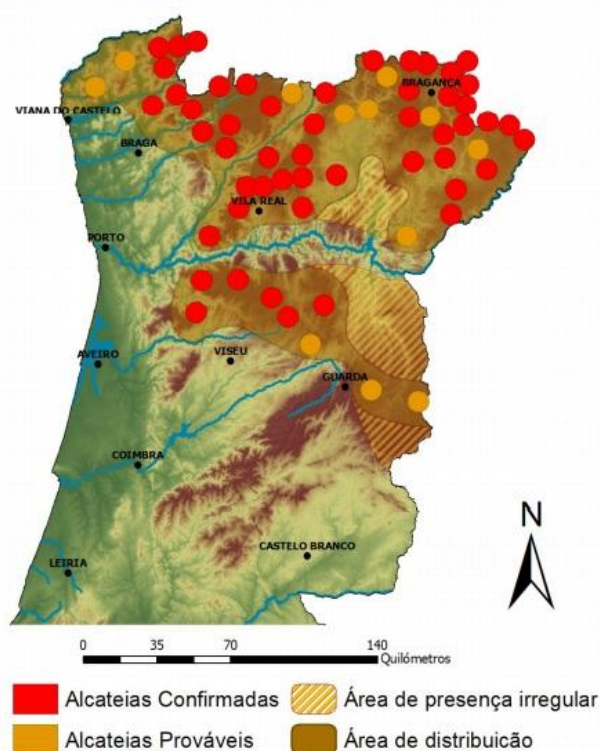


**Figura 1.** Evolução da distribuição do Lobo Ibérico em Portugal ao longo do século XX (Adaptado de Álvares, 2011).

Ao contrário do que se verifica em Espanha, onde o Lobo Ibérico se distribui por uma área de cerca de 100 000 km<sup>2</sup> (1/5 do país), em Portugal ocupa apenas uma área com extensão aproximada de 20,000 km<sup>2</sup>, correspondente as serras mais

agrestes, com menor densidade populacional humana e importante atividade agropecuária situadas na metade norte de Portugal (Nunes, 2000; Álvares, 2011).

Em Portugal, o efetivo populacional encontra-se dividido em dois núcleos distintos separados entre si pelo rio Douro, estimando-se que a totalidade da população lupina ronde os 300 indivíduos. A subpopulação a norte do Rio Douro distribui-se numa área de cerca de 12.500km<sup>2</sup> (densidade média de 1,6 a 3,0 lobos/100km<sup>2</sup>) e estima-se que possua entre 45 a 54 alcateias. A sua distribuição abarca parte importante dos distritos de Viana do Castelo e Braga, uma pequena porção do distrito do Porto, e a quase totalidade dos distritos de Vila Real e Bragança (Figura 2) (Nunes, 2000; Álvares, 2011). A subpopulação a sul do Rio Douro, é estimada entre 6 a 9 alcateias, e encontra-se distribuída numa área de cerca de 3.800km<sup>2</sup> (densidade média de 0,5 a 1,3 lobos/100km<sup>2</sup>), e tem vindo a demonstrar uma crescente instabilidade reprodutora e um elevado nível de fragmentação (Álvares, 2011).



**Figura 2.** Situação atual do lobo em Portugal (Adaptado de Álvares, 2011).

De acordo com os resultados do Censo Nacional do Lobo 2002/2003, o número de alcateias portuguesas varia entre as 45 e 55 para a subpopulação a

Norte do Douro, não ultrapassando as 10 para a subpopulação a Sul do mesmo, pelo que com base na biologia da espécie, estima-se que o efetivo populacional varie entre os 200 e os 400 indivíduos (ICN, 2006).

Apesar da área de distribuição mundial se encontrar bastante reduzida e fragmentada relativamente à original, esta espécie parece estar a recuperar em grande parte a sua área de distribuição europeia, nomeadamente em algumas regiões Espanholas. Em Portugal, a tendência populacional parece ser, no que se refere à subpopulação do Norte do Douro, de estabilidade, com ligeiros aumentos/decréscimos a nível local, sendo que para a subpopulação a Sul do Douro, a tendência deverá ser de declínio (ICN, 2006).

### **2.1.2. MORFOLOGIA**

O Lobo Ibérico (*Canis lupus signatus*) é uma subespécie do lobo-cinzento (*Canis lupus*). Mede em média, 70cm e pesa entre 25 e 40kg (Costa, 2010). Esta subespécie apresenta manchas avermelhadas na região caudal das orelhas e manchas mais claras no focinho e garganta. Os olhos são oblíquos e cor de topázio. Embora faça lembrar um cão de raça pastor alemão, é na realidade mais magro, com o peito mais estreito, membros mais compridos e almofadas plantares mais desenvolvidas. Possui a região anterior do corpo bem desenvolvida e uma região lombar forte e ligeiramente arredondada. A cabeça é volumosa e alongada, de aspeto maciço com orelhas triangulares, rígidas e relativamente curvas (Costa, 2010).

Esta subespécie (*Canis lupus signatus*) distingue-se das restantes por apresentar um tronco em geral de cor castanha amarelada, mais ou menos escuro nos flancos e muito negro no dorso. As faces são cinzento escuro com um traço branco sujo e o focinho de cor ruivada. Caracteristicamente possui no dorso uma lista negra que se prolonga até à cauda e os membros dianteiros apresentam uma faixa longitudinal negra (Figura 3, página 7), sendo a restante pelagem normalmente avermelhada, variando individualmente para tonalidades mais claras ou escuras (Carreira, 2010; Costa, 2010).



**Figura 3.** *Canis lupus signatus* (Adaptado de Anónimo, s/d).

### **2.1.3. REPRODUÇÃO**

A alcateia, unidade social típica desta espécie, é constituída por animais com grau de parentesco relativamente próximo. Em Portugal as alcateias são geralmente compostas por um par reprodutor, 1 a 3 lobos juvenis (< 2anos de idade) e 4 a 6 crias que nascem em cada ano (Petrucci-Fonseca, 1990).

A maturidade sexual desta espécie é atingida com cerca de 2 anos de idade, altura em que abandonam a alcateia em busca de parceiro e novo território para se estabelecerem. O acasalamento ocorre em Fevereiro-Março e o parto ocorre após cerca de 2 meses de gestação. As crias nascem com os olhos fechados e, até às 3 semanas, têm os seus movimentos bastante limitados. A proximidade de um curso de água e uma baixa perturbação humana são fatores que parecem determinar a escolha do local de cria, à medida de vão crescendo os locais onde os lobachos permanecem são cada vez mais distantes do local de nascimento (Petrucci-Fonseca, 1990).

Em geral, todos os indivíduos da alcateia participam na criação dos lobachos, pelo que durante a época de dependência das crias (Maio a Outubro) a área utilizada pela alcateia é geralmente maior e os animais utilizam mais intensamente o local onde nascem as crias, que se situa normalmente no centro, ou

próximo do centro, da área vital. Por volta dos finais de Outubro, inícios de Novembro, os lobachos são quase do tamanho dos restantes membros da alcateia e começam a acompanhar o grupo de caça, sendo nesta altura que se verifica um aumento da área utilizada pela alcateia que deixa de estar dependente do local de criação (Petrucci-Fonseca, 1990).

#### **2.1.4. ESTATUTO DE CONSERVAÇÃO**

Segundo a UICN (*International Union for Conservation of Nature*), o lobo apresenta a nível Mundial, desde 1996, o estatuto de “Baixo Risco”, com indicação de dependente de conservação para a Península Ibérica. A nível da Comunidade Europeia, o lobo é considerado uma espécie prioritária para a conservação segundo a Diretiva de Habitats (Mech & Boitani, 2008; Boitani, 2000). Em Portugal o lobo tornou-se a primeira espécie protegida por legislação específica, no final da década de 1980. A Lei 90/88 de 13 de Agosto, posteriormente regulamentada pelo Decreto-Lei 139/90 de 27 de Abril, previu a total proteção deste carnívoro em Portugal, sendo proibido o seu abate ou captura, a destruição ou deterioração do seu habitat e a sua perturbação, em especial durante os períodos de reprodução e dependência das crias (Artigo 1º, alíneas a, b e c). Este Decreto-Lei contempla, ainda, a compensação financeira aos proprietários dos animais domésticos atacados pelo lobo em toda a sua área de distribuição nacional. Porém, esta medida de conservação já se verificava desde 1975, mas apenas na área do Parque Nacional da Peneda-Gerês (SNPRCN, 1990).

Tendo em conta a drástica redução da distribuição nas últimas décadas, o reduzido tamanho populacional (inferior a 250 indivíduos maduros), e a existência de várias ameaças à sua sobrevivência, o lobo encontra-se classificado no Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal com o estatuto de espécie “*Em Perigo De Extinção*” (EN) há mais de duas décadas (SNPRCN, 1990; Queiroz *et al.*, 2005). Este canídeo encontra-se ainda protegido por convenções e diretivas internacionais ratificadas pelo Estado português (Diretiva 92/43/CEE transportada para a jurisdição interna pelo decreto-Lei nº 140/99, de 24 de Abril, com a redação dada pelo Decreto-Lei nº 49/2005, de 24 de Fevereiro). Esta espécie encontra-se ainda incluída no Anexo II da CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies de Fauna e Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção) e no Anexo II da Convenção de

Berna (Convenção Relativa à Conservação da Vida Selvagem e dos Habitats Naturais da Europa) (ICN, 2006).

## **2.1.5. RECUPERAÇÃO/PRESERVAÇÃO DA ESPÉCIE**

### **2.1.5.1. PROGRAMA SIGNATUS**

Fundado em 1987, contribui através de uma abordagem multidisciplinar para a realização de um plano de conservação do lobo em Portugal. Utiliza a investigação aplicada para promover e realizar projetos e estudos técnico-científicos, no âmbito da biologia e antropologia, conducentes a um melhor conhecimento do lobo e das interações Homem-Lobo. Utiliza a educação ambiental na divulgação de informação correta acerca deste predador e promove medidas práticas de conservação de forma a colaborar para uma verdadeira política de conservação, não só deste canídeo mas também do Património Natural Português em geral (Lobo, 2009).

### **2.1.5.2. CENTRO DE RECUPERAÇÃO DO LOBO IBÉRICO (CRLI)**

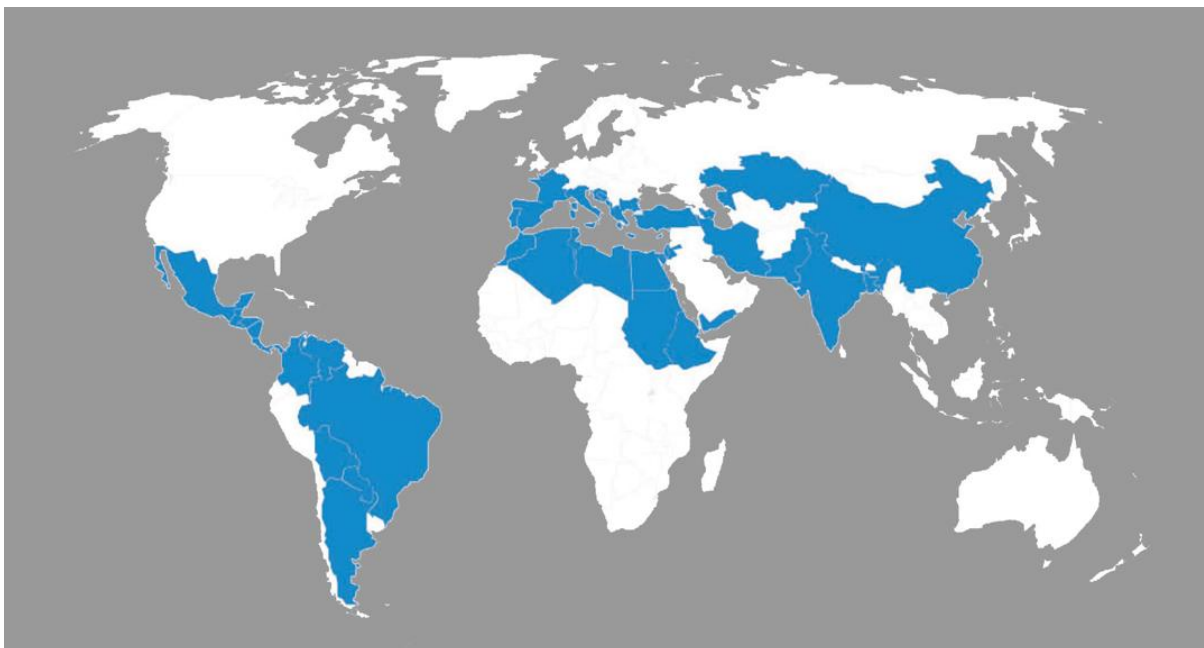
Criado em Mafra, no ano de 1987, com o objetivo de providenciar, em cativeiro, um ambiente adequado para efetivos lupinos que não possam viver em liberdade, atualmente o CRLI ocupa cerca de 17 hectares de terreno, num arborizado e isolado vale, caracterizado por uma boa cobertura vegetal e topografia heterogénea, proporcionando aos lobos residentes bons abrigos e condições de refúgio. Os efetivos podem ser observados através da existência de torres de observação, situadas em pontos estratégicos. O CRLI ao mesmo tempo que providencia os melhores cuidados tenta proporcionar a realização de estudos, sobretudo na área do comportamento social que, associados a investigações realizadas na Natureza servem de base para campanhas de divulgação, que procuram informar o público sobre a verdadeira natureza do lobo (Lobo, 2009).

### **2.1.5.3. ASSOCIAÇÃO DE CONSERVAÇÃO DO HABITAT DO LOBO IBÉRICO (ACHLI)**

A ACHLI é uma associação, sem fins lucrativos, criada a 9 de Março de 2006 por um grupo de empresas relacionadas com a implementação de projetos eólicos (Eólica da Cabreira, S.A., Eólica da Arada – Empreendimentos Eólicos da Serra da Arada, S.A. e Eólica de Montemuro, S.A., nas Serras da Freita, Arada e Montemuro). Tem como missão contribuir para a preservação da paisagem natural e cultural de áreas sensíveis em território nacional, em particular nas áreas onde se detete a presença do Lobo Ibérico e é levada a cabo através do desenvolvimento de projetos que procuram representar mais-valias para a conservação do habitat do Lobo Ibérico. Todos os projetos têm em consideração o estado atual das alcateias para as áreas onde estão previstos, assim como a sua envolvente socioeconómica, aspeto muitas vezes determinante para o sucesso da sua implementação (ACHLI, 2011)

## 2.2. LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas causadas por várias espécies do género *Leishmania*, transmitidas por insetos vetores que afetam tanto o ser humano como animais domésticos e silváticos, e que apresenta uma ampla distribuição geográfica, estando presentes em todos os continentes com exceção da Antártida (Figura 4) (Desjeux, 2004).



**Figura 4.** Países com elevado risco de ocorrência da Leishmaniose visceral e cutânea no Mundo (Adaptado de WHO, 2013).

As formas clínicas da doença refletem complexas interações da virulência da espécie/estirpe infetante com a resposta do hospedeiro, podendo resultar em infeção assintomática; lesões cutâneas confinadas à pele ou envolvimento secundário de metástases na mucosa nasal ou orofaríngea; e em casos mais graves e, por vezes, fatais, a afeção de órgãos do sistema mononuclear fagocítico (Singh *et al.*, 2005).

Atualmente sabe-se que a doença pode ser provocada por mais de vinte espécies de protozoários pertencentes ao género *Leishmania* (Bañuls *et al.*, 2007) e a infeção pode ser transmitida aos seres humanos por cerca de trinta espécies diferentes de flebótomos (Chappuis *et al.*, 2007).

A leishmaniose apresenta-se, assim, como um problema epidemiológico complexo, com crescente importância em Saúde Pública, devido sobretudo ao facto

de ser negligenciada quer a sua vigilância quer o seu controlo sanitário (Desjeux, 2004).

### 2.2.1. ETIOLOGIA

A diferenciação em espécies do género *Leishmania* tem sido problemática com o decorrer dos anos, e sujeita a variadas mudanças taxonómicas, visto a morfologia do parasita, não ser um critério útil para a sua diferenciação. Assim, atualmente o modelo taxonómico aceite é baseado na identificação de isoenzimas. A técnica de eletroforese efetuada a um determinado grupo de isoenzimas permite individualizar zimodemes, que são um conjunto de parasitas com o mesmo perfil enzimático (Campillo *et al.*, 1999). Como a taxonomia varia consoante o autor, considera-se apenas importante referir as espécies existente no Velho e Novo Mundos (Tabela 1) (Greene, 2006).

**Tabela 1.** Espécies de *Leishmania* existentes (Adaptado de Greene, 2006).

Velho Mundo	Novo Mundo
<i>Leishmania donovani</i>	<i>Leishmania chagasi</i> (sin. <i>L.infantum</i> )
<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
<i>Leishmania tropica</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
<i>Leishmania aethiopica</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>Leishmania major</i>	<i>Leishmania panamensis</i>
	<i>Leishmania peruviana</i>
	<i>Leishmania guyanensis</i>
	<i>Leishmania lainsoni</i>
	<i>Leishmania naiff</i>
	<i>Leishmania shawi</i>

A espécie *Leishmania donovani*, para além de não originar doença no canídeo, é considerada a espécie que mais frequentemente origina a leishmaniose visceral no Homem. A espécie *Leishmania infantum* é considerada o agente etiológico causador de doença no canídeo em Portugal, bem como em outros países da Europa do Sul (Rolão *et al.*, 2005).

O Observatório Português das Leishmanioses (ONLeish) com base em estudos de prevalência de Espanha, França, Itália e Portugal, revelou que cerca de

2,5 milhões de cães estão infetados com *L. infantum*. Apresentou também dados, obtidos em estudos de seroprevalência realizados em Portugal, que indicam algumas regiões do país como endémicas, designadamente Trás-os-Montes e Alto Douro, a sub-região da Cova da Beira, os concelhos da Lousã e de Évora, a região de Lisboa e Setúbal e o Algarve. Adicionalmente em quase todo o território continental já foram detetados casos de leishmaniose canina, como ilustra a Figura 5 (ONLeish, s/d).

Apesar do reservatório principal da *L. infantum* ser o cão (*Canis familiaris*), a leishmaniose canina já foi detetada em canídeos selvagens como por exemplo Chacal (*Canis aureus*), Raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) e Lobo (*Canis lupus*) (Satre *et al.*, 2008). No entanto, não há nenhum estudo que relate a prevalência de *L. infantum*, em lobos em cativeiro, em zonas endémicas na Europa (Satre *et al.*, 2008).

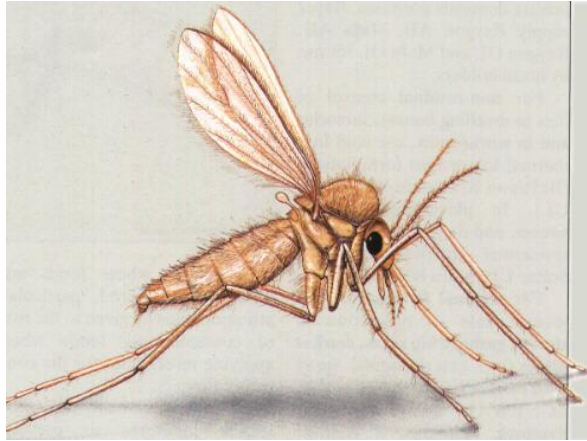


**Figura 5.** Mapa da prevalência de infecção por *L. infantum* em Portugal. (Adaptado de ONLeish, s/d).

### 2.2.2. TRANSMISSÃO

Os únicos vetores biológicos aceitos na transmissão das espécies de *Leishmania* são os flebótomos (Dantas-Torres, 2011). Estes são dípteros hematófagos pertencentes à família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*. Na infecção canina estão envolvidos dois gêneros: o gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e o gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo. Na Europa, estes insetos exibem atividade crepuscular e noturna, que se estende desde o final da Primavera até ao final do Outono (Paltrinieri *et al.*, 2010). Os flebotomíneos (Figura 6, página 15) são insetos muito pequenos que medem entre 2 a 3 mm que dependem da ingestão de sangue para a maturação dos seus ovos, sendo apenas as fêmeas hematófagas. Essa ingestão ocorre geralmente durante a noite com um pico de alimentação entre a 3h30 e as 5h30. Nos climas temperados, a maturação dos flebótomos é muito lenta durante as épocas frias; por outro lado, durante as épocas mais quentes poderão existir dois ciclos completos de desenvolvimento (Ciaramella & Corona, 2003). Apesar de nos últimos anos terem surgido novos debates acerca do papel vetorial das carraças e pulgas na *L. infantum*, não existem ainda provas que comprovem o seu envolvimento no ciclo de transmissão (Coutinho *et al.*, 2005; Dantas-Torres, 2011).

A transfusão sanguínea, a transmissão vertical e a transmissão venérea, apesar de ainda pouco claras, já foram descritas como meios de transmissão não convencionais de Leishmaniose (Figura 8, página 16) (Owens *et al.*, 2001; Rosypal *et al.*, 2005; De Freitas *et al.*, 2006; Tabar *et al.*, 2008; Pangrazio *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Boggiatto *et al.*, 2011).

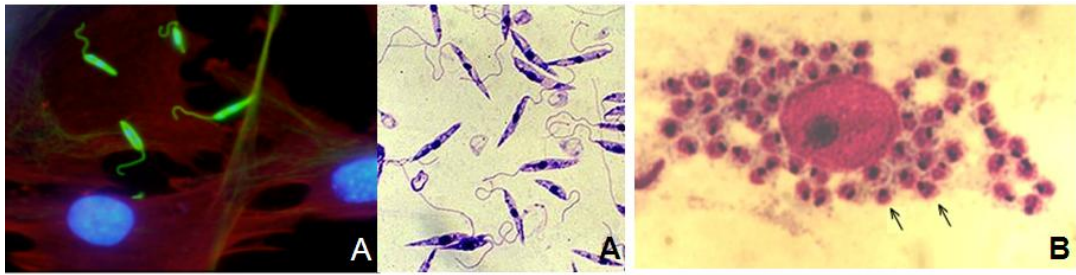


**Figura 6.** Phlebotomus spp. (Adaptado de <http://ruby.fgcu.edu/courses/davidb/50249/web/fly1.htm>).

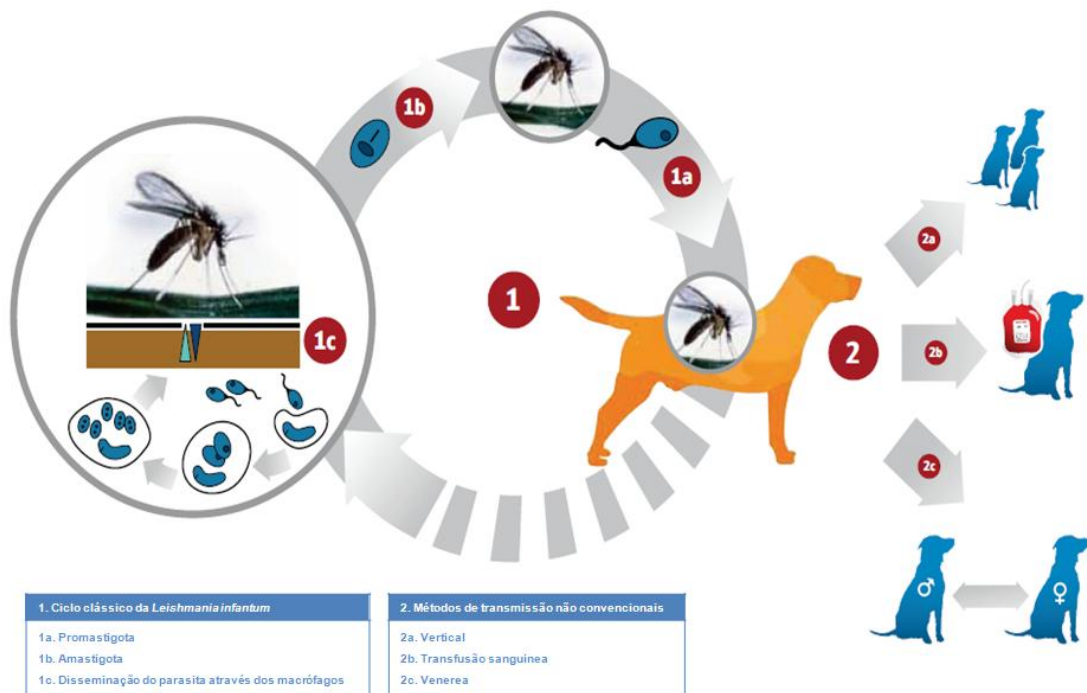
### **2.2.3. CICLO DE VIDA**

O ciclo biológico inicia-se quando o flebótomo ingere sangue do hospedeiro infetado, ingerindo também as formas amastigotas (Figura 7A, página 16). Os flebótomos alimentam-se principalmente em zonas de pele onde o pelo é mais escasso ou mesmo glabras, tal como a cabeça, focinho, pavilhões auriculares e em áreas inguinais e perineais (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Após a picada do flebótomo no hospedeiro infetado, os parasitas desenvolvem-se em formas promastigotas extracelulares (Figura 7B, página 16) no intestino do flebótomo durante aproximadamente 1 semana (Weese & Fulford, 2011), daí migram em direção ao probóscide, onde vão subsequentemente ser transferidas para o hospedeiro vertebrado (Ciaramella & Corona, 2003).

O ciclo de transmissão fica completo quando o flebótomo infetado se alimenta de outro hospedeiro vertebrado suscetível, as formas promastigotas são inoculadas na pele do hospedeiro final e são fagocitadas por macrófagos convertendo-se em amastigotas, dando-se posteriormente a replicação do parasita (Figura 8, página 16) (Solano-Gallego *et al.*, 2011).



**Figura 7.** Forma Promastigota (A); Forma Amastigota (B) (Anónimo, s/d).



**Figura 8.** Métodos convencionais e não convencionais de transmissão de *Leishmania infantum* (Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011).

## 2.2.4. SINAIS CLÍNICOS

É importante perceber que a Leishmaniose canina, sendo uma doença sistêmica, possui grande variabilidade clínica, quadro sintomatológico este particular e único para cada animal infetado. Não obstante, pode considerar-se que as formas progressivas, de curso crônico e implicação viscerocutânea, são a apresentação clínica mais frequente na Bacia Mediterrânea (Campillo *et al.*, 1999).

Estudos de populações em áreas endêmicas mostram que uma parte da população canina desenvolve doença sintomática, outra fração infecção assintomática e que uma terceira é resistente à infecção (Maia *et al.*, 2007).

A Leishmaniose visceral, sendo uma doença crônica, apresenta sinais clínicos que podem desenvolver-se 3 meses a 7 anos após a infecção. A manifestação clínica inicial corresponde a uma alteração do estado orgânico do animal, com perda de peso progressiva, apesar de ligeira, acompanhada de astenia, apatia e em casos extremos anorexia e febre (Figura 9), pelo que é denominada de síndrome geral inespecífica, de instalação insidiosa e evolução progressiva (Greene, 2006).



**Figura 9.** Canídeo com perda de peso extrema, astenia e apatia (Fotografia original).

As principais lesões ocorrem a nível renal, hepático, órgãos linfóides e dermatológico, contudo também se podem encontrar lesões oculares, ósseas e articulares e ao nível do sistema nervoso central (Campillo *et al.*, 1999; Elliott & Grauer, 2007).

A nível renal origina-se uma nefropatia crônica proliferativa que afeta os glomérulos, túbulos renais e ainda tecido intersticial, constituindo uma das lesões mais características da leishmaniose. Tais lesões fazem com que se verifique um aumento progressivo dos parâmetros de função renal (ureia, creatinina e proteinúria) (Campillo *et al.*, 1999; Elliott & Grauer, 2007).

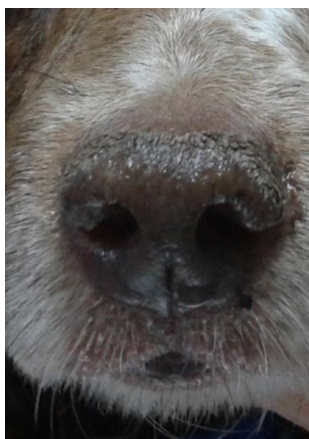
A prevalência de lesões cutâneas em cães com leishmaniose sintomática varia entre os 56% e os 90%. A sintomatologia dermatológica normalmente ocorre isolada, sem outros sinais óbvios de doença sistémica. Nunca se deve, contudo, assumir que um animal com sintomatologia exclusivamente dermatológica não tem envolvimento visceral, já que o parasita se dissemina pelo organismo antes de as lesões de pele generalizarem (Greene, 2006). O quadro lesional cutâneo tem como lesão básica a dermatite crônica proliferativa, que também se pode manifestar como

dermatite descamativa-pustular, ulcerativa ou nodular (Campillo *et al.*, 1999). Estas lesões podem variar em carácter e extensão, mas raramente são pruríticas. A maior parte dos animais desenvolve alopecias progressivas e simétricas, principalmente localizadas na face, na região periocular e perilabial (Figura 10), que se estendem posteriormente por todo o corpo. Frequentemente, os animais apresentam feridas ulcerativas e de difícil cicatrização. A estas lesões está geralmente associada uma dermatite exfoliativa e uma seborreia seca generalizada. Em casos mais progressivos, alguns animais desenvolvem ulcerações no nariz e nos pavilhões auriculares. O nariz pode ainda apresentar processos degenerativos como hiperqueratose característica (Figura 11, página 19) ou então fissuras, que também podem ser encontradas nas almofadinhas plantares (Greene, 2006).

Menos frequentemente podem aparecer úlceras mucocutâneas, nódulos cutâneos, ou desenvolver-se erupções pustulosas (Greene, 2006). A descoloração pode ocorrer no exterior das narinas, sem haver sinais de ulceração, e em alguns casos pode-se estender às membranas mucosas (Blavier *et al.*, 2001).



**Figura 10.** Alopecia simétrica na região periocular (Fotografia original).



**Figura 11.** Hiperqueratose Nasal (Fotografia original).

Frequentemente ocorre linfadenopatia generalizada, que se manifesta com aumento do tamanho e consistência dos linfonodos superficiais, especialmente os poplíteos, pré-escapulares e submandibulares (Campillo *et al*, 1999).

As unhas normalmente têm um crescimento mais acelerado – onicogrifose (Figura 12) (Greene, 2006).



**Figura 12.** Onicogrifose (Fotografia original).

Apesar de aparecerem com menor frequência, as lesões a nível ocular também são muito características. As pálpebras apresentam frequentemente blefarite. As conjuntivites também são frequentes. A conjuntiva apresenta-se com ingurgitamento vascular, quemose e exsudados ou secreções mucopurulentas (Figura 13, página 20) (Sauquillo, 2005). Frequentemente observam-se processos inflamatórios nas glândulas lacrimais, mais propriamente nos ácinos glandulares, o que leva a uma diminuição quantitativa do líquido lacrimal, e conseqüentemente a

xeroftalmia e queratoconjuntivite seca (Figura 13). Sendo a úvea um tecido altamente vascularizado, surge frequentemente comprometida no decurso da doença, daí que a uveíte é uma patologia ocular frequente. A Leishmaniose pode ainda provocar o aparecimento de cataratas, como consequência de uveíte e da ocorrência de sinéquias da íris com o cristalino, ou como resultado de alterações na composição do humor aquoso/vítreo, estruturas fundamentais para o metabolismo do cristalino (Sauquillo, 2005).



**Figura 13.** Queratoconjuntivite seca e secreção mucopurulenta (Fotografia original).

Deve considerar-se que os animais também podem apresentar-se com sintomatologia articular e óssea, entre os quais claudicação de um ou vários membros, atrofia muscular (principalmente nos músculos temporais), inflamação a nível articular, crepitação e dor articular (Giménez & Menéndez, 2005).

A nível hepático, a lesão mais característica que se encontra é a hepatite crónica proliferativa. Por norma os níveis séricos das enzimas hepáticas (ALT e ALP) não se encontram muito elevadas, no entanto se a elevação das enzimas for acentuada denota lesão hepática grave, encontrando-se, assim, o animal em estadio terminal da doença (Campillo *et al.*, 1999).

A nível gastrointestinal, a diarreia é um dos sinais mais comuns em animais com leishmaniose. Esta ocorrência tem sido maioritariamente associada a insuficiência renal crónica ou insuficiência hepática, que se podem desenvolver no decurso da doença (Adamama-Moraitou *et al.*, 2007).

O período terminal da doença, que pode aparecer entre 3 a 8 meses após a infecção, caracteriza-se pelo agravamento do quadro clínico, sendo muito destacada a emaciação e o estado caquético do animal, em que se podem observar com facilidade as apófises espinhosas das vértebras e as costelas. Frequentemente instala-se uma insuficiência renal grave, que na maioria das ocasiões é a causa direta de morte. Também se podem presenciar situações de disfunção hepática e complicações por infecções secundárias, originando broncopneumonias e gastroenterites. Todos estes processos podem ocorrer e determinar a morte do animal (Campillo *et al*, 1999; Greene, 2006).

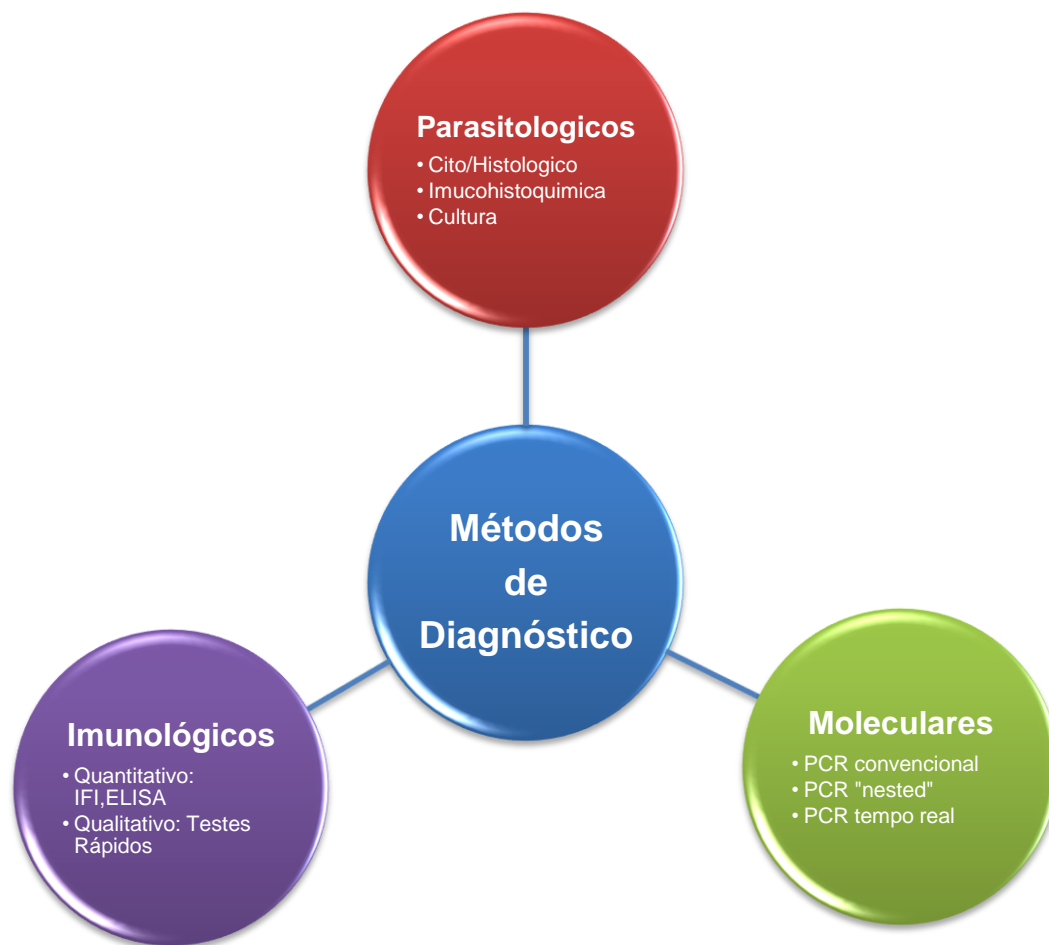
O quadro sintomático da Leishmaniose canina acompanha-se de uma série de alterações hematológicas e bioquímicas, muito variadas na sua apresentação e intensidade. As alterações bioquímicas mais consistentes são a hiperproteinémia (com valores entre 8-12g/dl), associada a hiperglobulinémia e hipoalbuminémia, resultando numa diminuição do rácio albumina/globulina para valores inferiores a 0,5 (Greene, 2006).

#### **2.2.5. DIAGNÓSTICO**

O leque sintomatológico juntamente com os dados epidemiológicos da região, anamnese, exame físico e alterações bioquímicas são, muitas vezes suficientes para o estabelecimento do diagnóstico da doença (Campillo *et al*, 1999).

No entanto, o seu diagnóstico também pode ser complicado em animais em fase latente e/ou com sintomatologia incomum. Nestes casos, é sempre conveniente a realização de métodos específicos e com elevada sensibilidade para a obtenção de um diagnóstico definitivo (Quadro 1, página 22) (Campillo *et al*, 1999).

**Quadro 1.** Meios de diagnóstico de Leishmaniose mais comuns (Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011).



#### 2.2.5.1. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

O objetivo de um diagnóstico parasitológico é sempre a observação direta ou indireta da presença do parasita através de amostras procedentes de um animal infetado. São métodos de especificidade elevada (~100%), no entanto de sensibilidade reduzida (~80%), que se encontram condicionados por certos fatores como a fase da doença, a carga parasitária e quantidade de amostras (Campillo *et al.*, 1999).

##### a) Métodos Diretos

A visualização de uma única célula parasitada com as formas amastigotas de *Leishmania* pelos métodos parasitológicos é patognomónica da existência de infeção (Maia, 2005).

O método de eleição para a recolha de amostras é a biópsia por aspiração de gânglios linfáticos ou medula óssea (Campillo *et al*, 1999). A punção ganglionar é normalmente realizada nos poplíteos e pré-escapulares respetivamente, que após recolhido, o tecido ganglionar é corado com Giemsa. Este método possui uma sensibilidade de cerca de 30% (Campillo *et al*, 1999). Em relação à punção de medula óssea, os locais preferenciais são o fémur, a crista ilíaca e a junção costovertebral. Dada a elevada concentração da forma parasitária existente nestes tecidos, considera-se um método mais sensível (60%), no entanto de difícil execução comparativamente com o método anterior (Campillo *et al*, 1999).

A Punção Aspirativa de Agulha Fina (PAAF) no baço também tem sido descrita, no entanto devido ao seu elevado grau de complicações e a necessidade de monitorização do paciente após recolha faz com que seja posta de lado na maioria dos casos. Também se podem realizar biópsias de pele aquando da presença de lesões cutâneas bem como realizar esfregaços com material subjacente de úlceras existentes em animais infetados (Campillo *et al*, 1999).

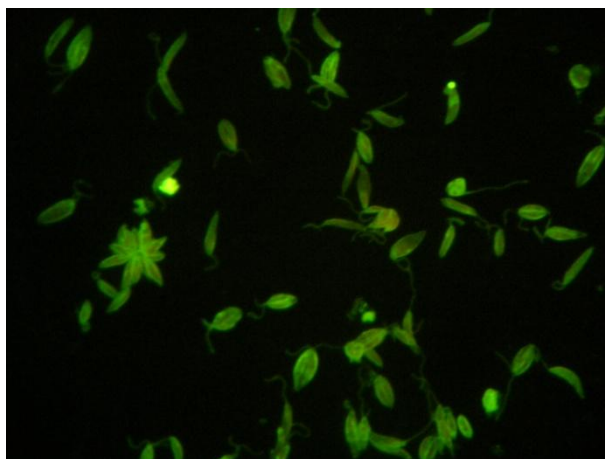
#### b) Métodos Indiretos

Estes métodos são limitados pela baixa sensibilidade e pela sua inconclusividade de resultados. Podemos destacar dois procedimentos: o isolamento de *Leishmania* em meio de cultura e a inoculação em animais de experimentação (xenodiagnóstico). Em relação ao primeiro, os meios mais adequados para o crescimento do parasita são os não definidos e bifásicos como o NNN (Novy, McNeal and Nicolle), semisólidos como agar-sangue semissólido de Locke, ou então meios de cultura líquidos como o RPMI 1640. As leishmanias tendem a desenvolver-se aproximadamente entre 6 a 15 dias com temperatura ótima de 22°C a 25°C (Campillo *et al*, 1999). Em relação ao segundo, é necessário a inoculação de uma amostra de tecido, procedente do animal em estudo, em animais de laboratório. O animal de eleição é o hamster e a inoculação de amostra realiza-se intraperitonealmente. É possível a observação de formas amastigotas nos macrófagos peritoneais ao fim de 3/4 semanas (Campillo *et al*, 1999).

### 2.2.5.2. DIAGNÓSTICO SEROIMUNOLOGICO

O objetivo destes métodos é verificar a existência de anticorpos específicos anti-leishmania, geralmente do tipo IgG, no soro sanguíneo. Atualmente são os métodos de diagnóstico mais utilizados na prática clínica. Apesar de serem métodos serológicos com elevada sensibilidade e especificidade, apresentam uma grande limitação no que diz respeito à impossibilidade de diagnosticar a doença quando ainda não se verifica a produção de anticorpos (Campillo *et al*, 1999). A seroconversão demora cerca de 1,5 a 3 meses após inoculação da forma infestante, e, nesta altura, é impossível encontrar anticorpos, o mesmo sucede em animais em que não ocorre estimulação da resposta humoral e posterior produção de anticorpos, como é o caso dos animais assintomáticos (Campillo *et al*, 1999). Podem também ocorrer falsos positivos através de reatividade cruzada em cães com leishmaniose cutânea, doença de Chagas, Ehrlichiose, Rickettsiose e Toxoplasmose (Gomes, 2008). Face a estes problemas, variadas pesquisas científicas avaliam o uso de anticorpos monoclonais para o diagnóstico de leishmaniose visceral, apresentando sensibilidade e especificidade de 90% e 100% respectivamente, no método de ELISA competitivo. Estes anticorpos monoclonais são direccionais contra epítomos antigénicos, e apesar disso, a reactividade cruzada também pode ocorrer devido aos epítomos compartilhados com a toxoplasmose (Gomes, 2008).

A imunofluorescência indireta (IFI) com a sua elevada especificidade (100%) e sensibilidade (98,4%-99,5%) (Rosypal *et al.*, 2003) permite a deteção de anticorpos pela incubação de diluições seriadas de soro a testar com um antigénio de género *Leishmania*, em seguida adiciona-se um anti-anticorpo conjugado com fluoresceína e posteriormente observa-se ao microscópio a fluorescência. A existência de fluorescência amarelo-esverdeado sobre o parasita é indicativa de positividade de infeção (Figura 14, página 25). Por outro lado, a ausência de fluorescência, com manifestação de cor vermelha ou vermelho-acastanhado, é considerada negativa. A maior diluição do soro, onde se verifica a emissão de fluorescência, corresponde ao título de anticorpos (Maia, 2005). É considerado um bom teste serológico, podendo ser utilizado como contraprova do método de ELISA. Títulos de anticorpos na diluição de 1:64, consideram-se usualmente como positivos (Rosypal *et al.*, 2003).



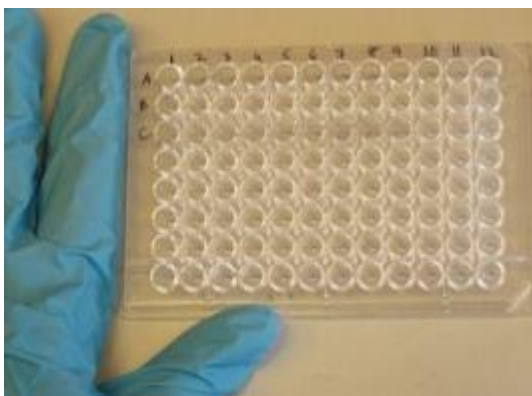
**Figura 14.** *Leishmania infantum* por imunofluorescência indireta (Adaptado de Instituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", s/d).

O método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), desenvolvido nos anos 70 e muito difundido a partir dos anos 80 com os ensaios para anticorpos anti-HIV, baseia-se na imobilização de um dos componentes, antígeno ou anticorpo, em fase sólida (componentes fixados), e na utilização de um conjugado, que também pode ser antígeno ou imunoglobulina, ligado a uma enzima. A adição de um substrato logo após leva a formação de um produto colorido, alteração de cor essa posteriormente lida através da utilização de um espectrofotômetro, que determina a relação entre a intensidade da cor e a quantidade do que está a ser analisado na amostra. É utilizado para a detecção de antígenos (hormonas, drogas, marcadores tumorais, alérgenos) e de anticorpos (contra bactérias, vírus, fungos e protozoários).

No método indireto, as placas são pré-incubadas com os antígenos contra os quais se quer detectar a produção de anticorpos; atualmente compram-se placas contendo alguns tipos de antígenos já padronizados. Depois da pré-incubação, as placas devem ser lavadas para retirar os antígenos não aderidos e incubadas com soluções proteicas com o objetivo de bloquear os locais não ocupados pelos antígenos (Faulkner, 2010; Moreira *et al*, 2011). Esta etapa é importante porque, como estas placas apresentam capacidade de absorver proteínas, os anticorpos ou outras moléculas presentes nos líquidos analisados podem associar-se à placa e alterar os resultados (Faulkner, 2010). Após o bloqueio, as amostras de soro são incubadas, por períodos de tempo e temperatura padronizados; em seguida, as placas são lavadas para retirar os anticorpos não específicos e incubadas com

anticorpos específicos para o primeiro anticorpo, marcados com uma enzima. Após uma última lavagem, adiciona-se o substrato e o cromógeno sendo, por fim, analisada a reação enzimática (Faulkner, 2010; Moreira *et al*, 2011). A reação final da ação da enzima deve ser lida em espectrofotómetro no comprimento de onda com variação de 405 a 492nm (Tizard, 2009; Santarém *et al.*, 2010).

Em relação à especificidade e sensibilidade é equiparável ao método IFI (Campillo *et al.*, 1999), contudo, existem autores que afirmam que o método de ELISA demonstra maior grau de sensibilidade que o método IFI, mas menor especificidade (Távora *et al.*, 2007). No entanto, ELISA destaca-se como método de eleição, por apresentar elevada especificidade/sensibilidade e pela facilidade e versatilidade de emprego, quando comparado com outros métodos utilizados na rotina para o imunodiagnóstico de patologias (Moreira *et al*, 2011), geralmente realizada em placas de 96 poços (Figura 15), o que possibilita a utilização de um maior número de amostras num único ensaio (Faulkner, 2010).



**Figura 15.** Placas ELISA de 96 poços (Adaptado de Anónimo s/d).

O método de aglutinação direta é também uma técnica de elevada sensibilidade e especificidade, e tem como vantagens o baixo custo empregue e a ausência de equipamento específico para a sua realização (Campillo *et al*, 1999).

Podem, também, ser utilizados os “kits” de imunocromatografia rápida que são bastante atrativos devido ao seu formato individual, de uso fácil e rápida resposta, o que permite ao Médico Veterinário dispor de informação muito rapidamente. O aparecimento de duas linhas, uma de controlo e uma de teste (independentemente da intensidade da coloração), representa um resultado positivo (Figura 16, página 27) (Maia e Campino, 2008). Contudo, estes testes apenas permitem uma avaliação qualitativa (Solano-Gallego *et al.*, 2011) e o seu desempenho em termos de sensibilidade, sobretudo em cães infetados

assintomáticos, é geralmente mais baixo que o dos testes de ELISA e IFI (Paltrinieri *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011).



**Figura 16.** Teste rápido positivo para leishmaniose canina (Fotografia original).

Outros métodos serológicos incluem técnica de imunotransferência (Immunoblot), reatividade contra proteínas recombinantes, fixação do complemento, hemaglutinação indireta, aglutinação direta das formas amastigotas ou promastigotas, imunoeletroforese, entre outros (Rosypal *et al.*, 2003).

### 2.2.5.3. TÉCNICAS MOLECULARES

Estas técnicas utilizam a biologia molecular na detecção de fragmentos de ADN do parasita nos tecidos do animal infetado, de forma a colmatar as limitações encontradas nos métodos serológicos. A técnica mais utilizada é o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pois apresenta um elevadíssimo grau tanto de sensibilidade como de especificidade, por estas razões pode ser considerado o “gold-standard” na detecção de infeção das espécies de *Leishmania* (Gomes *et al.*, 2008). No entanto os falsos negativos continuam a poder tornar-se uma realidade quando existe uma pequena quantidade de parasitas. O tecido de recolha de amostra de eleição é o aspirado de medula óssea, seguido dos linfonodos e por fim o sangue (Rosypal *et al.*, 2003). Os três protocolos mais comumente usados são o PCR convencional, PCR “nested” e PCR em tempo real que pode proporcionar análise quantitativa (Paltrinieri *et al.*, 2010).

### 2.2.6. TRATAMENTO

O tratamento de animais infetados para além de só ser parcialmente eficaz é difícil, demorado e de elevado custo, observando-se na maioria dos casos apenas uma remissão da sintomatologia e não a eliminação total do parasita. Regra geral os animais recidivam entre os 6 meses e os 2 anos após o final da terapêutica instituída. Tais fatos pensa-se resultarem da localização intracelular do parasita, do alojamento das formas amastigotas em determinados tecidos, do desenvolvimento de resistências farmacológicas e da necessidade de uma resposta imunitária eficaz. Como tal, é fundamental a obtenção de um diagnóstico precoce e a aplicação de um tratamento adequado (Campillo *et al*, 1999).

Em canídeos que se encontrem seriamente doentes ou que desenvolvam insuficiência renal grave, pode ser necessário restaurar os fluidos e o equilíbrio ácido-base antes da instituição de qualquer terapêutica (Greene, 2006). É necessário monitorizar a resposta terapêutica mediante a evolução da estadiologia clínica do animal e os parâmetros bioquímicos e hematológicos medidos após o tratamento instituído normalmente a cada 3/6 meses (Campillo *et al*, 1999).

Os antimoniais pentavalentes são a primeira escolha no tratamento de leishmaniose visceral canina. Estes inibem seletivamente as enzimas protozoárias responsáveis pela glicose e oxidação dos ácidos gordos bloqueando o metabolismo do parasita (Greene, 2006). O antimoniato de meglubina (Glucantime<sup>®</sup>) e o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) são os compostos antimoniais normalmente administrados. Os antimoniais pentavalentes (Sb<sup>5+</sup>) são rapidamente excretados pela urina e apenas uma pequena parte é reduzida para o seu composto tóxico (antimoniais trivalentes - Sb<sup>3+</sup>). Contudo, doses normais do fármaco raramente causam toxicidade, a não ser que a duração do tratamento se prolongue por mais de dois meses ou quando é administrado a pacientes com insuficiência renal, cardíaca ou hepática (Greene, 2006).

A miltefosina (Milteforam<sup>®</sup>) é um alquilfosfolípido com atividade anticancerígena, antimetabólica e leishmanicida que induz uma alteração da biossíntese de glicolípidos e glicoproteínas membranares do parasita. Estudos revelam eficácia de 93,9% frente a eficácias de 92,1% em animais tratados com antimoniato de meglumina (Corrales, 2005).

O alopurinol é um análogo da purina com atividade leishmaniosstática, que provoca alterações na tradução proteica e inibição da multiplicação do parasita (Greene, 2006). É utilizado sobretudo na prevenção de recidiva após tratamento leishmanicida (Rosypal *et al.*, 2003). É fácilmente adquirido, barato e com baixos efeitos adversos quando comparado com os antimoniais pentavalentes, por isso, em casos de insuficiencia renal, o alopurinol é preferível aos antimoniais (Greene, 2006). Este composto é muitas vezes terapeutica coadjuvante dos antimoniais, visto prolongar os periodos de remissão clínica e posterior aparecimento de recidivas, deve, no entanto, ser continuado após termino dos antimoniais (Greene, 2006). Apesar do tratamento ser eficaz e promover remissão da sintomatologia existente, os canídeos possuem formas parasitárias em circulação durante e após o tratamento e conseqüentemente permanecem como reservatórios activos e com elevado poder infetante (Cavaliero *et al.*, 1999).

A anfotericida B é um macrolito polieno utilizado principalmente como fármaco anti-fúngico mas possui também actividade anti-protozoária, através do mecanismo de alteração da permeabilidade da membrana celular. Contudo, é extremamente nefrotóxico, causando vasoconstrição renal e redução da taxa de filtração glomerular (Greene, 2006).

A marbofloxacina é uma fluoroquinolona com actividade antibacteriana, antineoplástica e antiparasitária, que actua através da inibição da enzima topoisomerase II, enzima essa fundamental para a duplicação do ADN parasitário (Vouldoukis *et al.*, 2006).

A associação de metronidazol e espiamicina tem sido eficaz e bem tolerada em animais infetados, sendo considerada um tratamento de segunda linha e muito útil em animais não responsivos ou intolerantes ao tratamento clássico (Pennisi *et al.*, 2005). Além desta é também frequente administrar enrofloxacin isolada ou em combinação com o metronidazol. A enrofloxacin é uma fluoroquinolona e o seu mecanismo de acção é semelhante ao da marbofloxacina, a razão pela qual é utilizada é pelo aparecimento frequente de infecções bacterianas secundárias sobretudo na pele e por interferir de alguma maneira na replicação do ADN do protozoário. Por outro lado, o metronidazol, para além de ser um fármaco com actividade antibacteriana, anti-protozoária e anti-inflamatória, também interfere com a replicação do ADN parasitário (Bianciardi *et al.*, 2004).

A domperidona (Leisguard<sup>®</sup>) antagonista da dopamina benzimidazole tem um efeito direto no sistema imunológico do animal, melhorando a sua resposta celular, permitindo-lhe combater de forma eficaz a infecção. Funciona de igual modo em cães saudáveis e infetados. Podendo, assim, ser usada quer na prevenção quer no tratamento de fases iniciais da doença sem interferir com qualquer teste de diagnóstico ou com outras terapias. Em cães saudáveis, seronegativos, que nunca exibiram sinais de infecção, mas que vivem ou viajam para áreas endémicas e, portanto, estão sujeitos a múltiplas exposições ao parasita, este fármaco reduz drasticamente o risco de desenvolver infecção ativa e/ou doença clínica por estimular a imunidade celular do animal. Em cães já infetados, seropositivos, ajuda a combater de forma eficaz a leishmaniose nos seus estágios iniciais e controla a progressão da doença (Gómez-Ochoa *et al.*, 2007).

Pensa-se que a prednisolona altere os recetores plaquetários envolvidos na agregação plaquetária, de modo que os anticorpos anti-plaquetas não se possam ligar aos mesmos. A prednisolona é frequentemente utilizada em dose sub-imunossupressiva, de modo a controlar as lesões imunopatológicas, como glomerulonefrite, queratite, uveíte e poliartrite. No entanto, há que reter que a administração de doses imunossupressivas no tratamento da leishmaniose é perigosa, pois diminui a imunidade celular, imunidade esta importante no combate à infecção (Cortese *et al.*, 2007) (Tabela 2, página 31).

**Tabela 2.** Fármacos e combinações farmacológicas utilizadas no tratamento de Leishmaniose (Adaptado de Cavaliero *et al.*, 1999; Rosypal *et al.*, 2003; Corrales, 2005; Pennisi *et al.*, 2005; Greene, 2006; Vouldoukis *et al.*, 2006; Cortese *et al.*, 2007; Gómez-Ochoa *et al.*, 2007).

Fármaco	Via de Administração	Dosagem
<b>Antimoniato de Meglubina</b>	IV/SC/IM	100mg/kg/SID/IV/3-4sem 50mg/kg/SID/SC/3-4sem
<b>Estibogluconato de Sódio</b>	IV/SC	30-50mg/kg/4-6sem
<b>Miltefosina</b>	PO	2-3mg/kg/dia/refeição/28d
<b>Alopurinol</b>	PO	10-20mg/kg/SID/ <i>ad eternum</i>
<b>Anfotericida B</b>	IV lento 5/10min (diluído em soro glucosado 10-20ml)	0,5-0,8mg/kg/Q3d -> 8-10mg/kg
<b>Marbofloxacina</b>	PO	SID
<b>Metronidazol + Espiramicina</b>	PO	75.000UI espiramicina/12,5mg metronidazol/kg/SID/3-4sem
<b>Metronidazol e/ou Espiramicina</b>	PO	20mg/kg/SID/enrofloxacina 10mg/kg/SID/Metronidazol
<b>Domperidoma</b>	PO	1 ml/10 kg/BID/4sem,

#### 2.2.6.1. IMUNOPROFILAXIA

Uma vacina eficaz deveria ser capaz de induzir uma resposta imunitária potente e duradoura. Atualmente podemos referir 3 tipos de vacinas, as de primeira, segunda e terceira geração. De acordo com a OMS uma vacina só poderá ser comercializada se ultrapassar as 3 fases de experimentação. A Fase I baseia-se na comparação de sujeitos vacinados e placebo de modo a avaliar a imunogenicidade e segurança vacinal. De seguida a Fase II, onde se avalia a proteção induzida pela vacina em modelos experimentais e, por fim a, Fase III onde se analisa a eficácia vacinal contra a infeção natural, utilizando-a numa população reduzida de indivíduos. Se a vacina ultrapassar estas 3 fases poderá ser registada e industrializada na Fase IV contra populações mais alargadas. Atualmente estão a ser utilizadas vacinas constituídas pelo parasita completo morto ou frações do mesmo, antigénios vivos atenuados, péptidos sintéticos e imunogénicos expressos em vírus ou bactérias.

Todas elas têm-se revelado promissoras, contudo, ao passar para a fase seguinte (Fase III) os resultados tornam-se insatisfatórios (Palatnick-de-Sousa, 2008).

As vacinas de **Primeira Geração** são vacinas mortas ou inativadas, isto é o antigénio administrado morto, possuindo assim, uma distribuição reduzida, pois não existe qualquer replicação dentro do organismo, o que implica, conseqüentemente, uma dosagem elevada e múltipla (anualmente) (Palatnick-de-Sousa, 2008).

As vacinas de **Segunda Geração** são vacinas vivas geneticamente modificadas através da deleção de genes. Estas vacinas têm como desvantagem o poder de provocar infeção ao sujeito, e são consideradas eticamente inaceitáveis (Palatnick-de-Sousa, 2008).

As vacinas de **Terceira Geração** são vacinas de ADN mais estáveis, com mais baixo custo de produção e que possuem a flexibilidade de combinação de múltiplos genes numa simples vacina. O motivo pelo qual se acredita que produz uma resposta imune forte é devido à ativação de uma resposta imune inata através da replicação intensa no interior do organismo, levando à expressão da proteína recombinante por longos períodos de tempo. Contudo, até à data, ainda não atingiram a Fase III dos estatutos experimentais (Palatnick-de-Sousa, 2008).

Em Portugal já existe uma vacina contra a doença (CaniLeish<sup>®</sup>) à base de ESP (proteínas secretadas – excretadas) da *Leishmania infantum* (possuem uma maior capacidade de estimulação de linfócitos T quando comparadas com o antigénio do parasita inteiro), adjuvadas por um extrato purificado de Quillaja saponária (QA-21) (elevada capacidade de estimular uma resposta imunitária por linfócitos Th1 e ativar linfócitos T citotóxicos) (Rosa *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2012). A vacina é administrada em 3 doses intervaladas por 21 dias induzindo assim, uma resposta imunitária celular 3 semanas após a primeira toma (Moreno *et al.*, 2012). A atividade parasiticida estimulada pela vacina é mantida durante pelo menos um ano, pelo que a revacinação deverá ser efetuada anualmente de modo a manter a imunidade. Esta vacina deverá unicamente ser administrada em cães a partir dos 6 meses de idade, e todos os cães devem ser testados serologicamente antes da administração da primeira dose. No caso de o título ser baixo positivo deverá ser realizado outro teste serológico 3 meses mais tarde. Se daí resultar um título negativo, a vacinação poderá ser realizada; se o título for positivo o cão não deve ser vacinado. É recomendável um intervalo de pelo

menos 2 semanas entre a vacinação com CaniLeish<sup>®</sup> e a aplicação de outras vacinas. A informação sobre eficácia, em cães submetidos a exposições naturais múltiplas em zonas com alta pressão da infeção, demonstrou que, comparativamente com um cão não vacinado, um cão vacinado, apresenta um risco 3,6 vezes menor de desenvolver uma infeção ativa e um risco 4 vezes menor de desenvolver uma doença clínica (Virbac, 2011).

### **3. COMPONENTE PRÁTICA**

#### **3.1. OBJETIVOS**

Ao longo dos tempos, a fauna silvestre tem contribuído, direta ou indiretamente, para a disseminação de doenças infecciosas transmissíveis quer ao Homem quer aos animais domésticos. A crescente atividade humana, aliada ao aumento da densidade populacional e à facilidade de mobilidade de pessoas e animais que se observa nos dias de hoje, vieram favorecer a (re)emergência de diversas doenças um pouco por todo o mundo.

A monitorização da presença de patologias nos animais silvestres é fundamental no controle das zoonoses emergentes e na conservação das espécies.

Neste contexto, com o intuito de avaliar o papel do Lobo Ibérico enquanto reservatório para *Leishmania*, foi averiguada a presença de anticorpos IgG anti-*leishmania* em Lobo Ibérico do Parque Nacional Peneda-Gerês através do método ELISA.

#### **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram obtidas amostras de soro de Lobo Ibérico recolhidas previamente pelo Instituto de Conservação da Natureza e Biodiversidade no Parque Nacional da Peneda-Gerês.

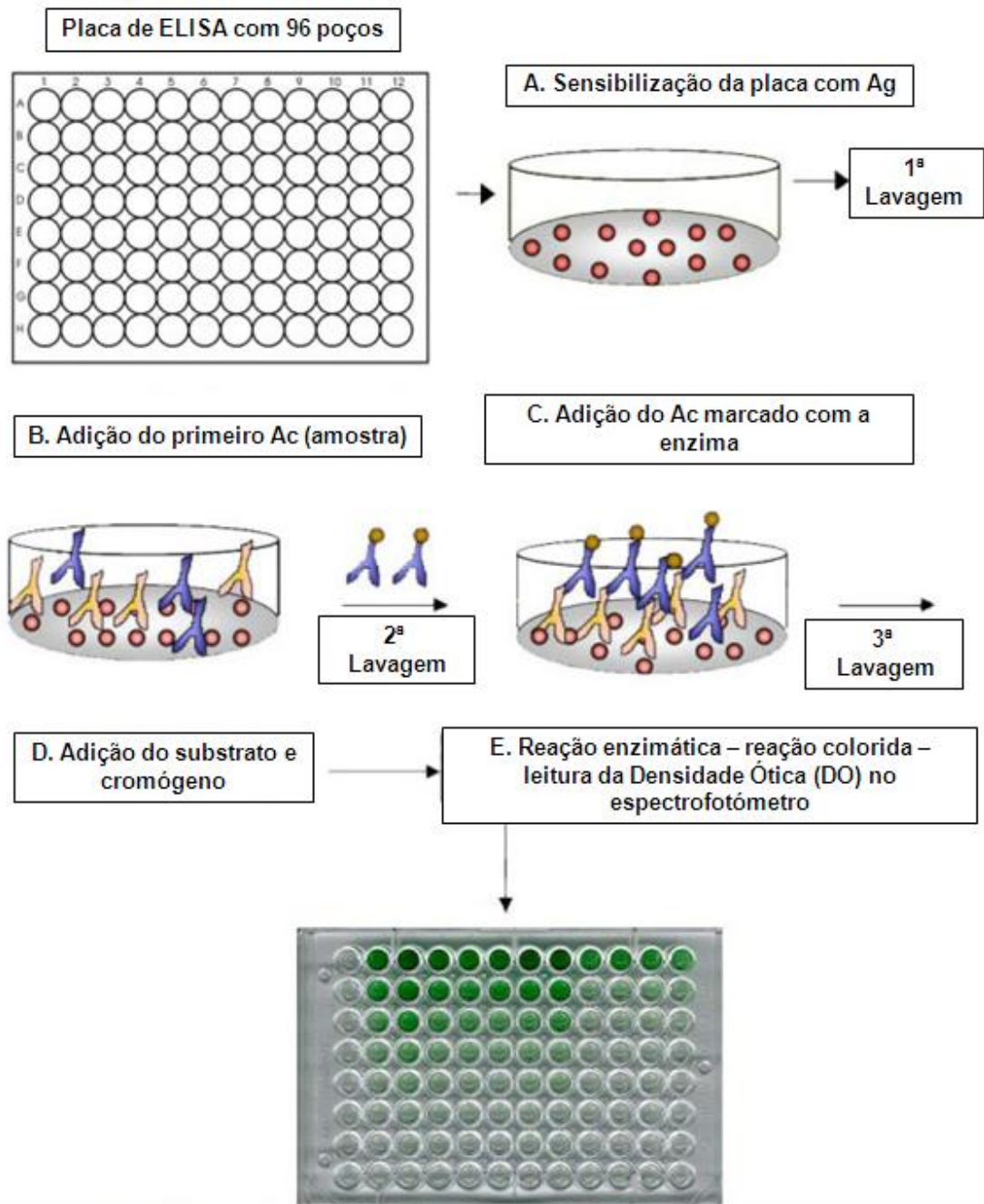
Todas as amostras foram testadas em duplicado. O valor do cut-off (0.156) utilizado neste trabalho foi determinado pelas curvas ROC aferidas em estudos prévios (Santarém *et al.*, 2010).

##### **3.2.1. O MÉTODO UTILIZADO**

A técnica de ELISA realizada neste trabalho foi adaptada de protocolos previamente descritos, com pequenas modificações (Santarém *et al.*, 2005).

Inicialmente as microplacas de ELISA foram sensibilizadas com 50ul de antigénio de *Leishmania* na concentração de 10ug/mL em tampão carbonato-bicarbonato a 0,05M com 9,6pH. Após incubação noturna a 4°C, as placas foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) com 7,4pH e descartado o conteúdo remanescente. Posteriormente o bloqueio foi feito com a adição de 200uL/poço de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e 3% de leite em pó desnatado durante

60 minutos a 37°C e, novamente, feitas três lavagens com PBS-T a 0,1%. Em seguida, foram adicionados 10uL/poço das amostras de soro em duplicado diluídas a 1:1500 em PBS-T com leite em pó desnatado. Após 30min de incubação a 37°C, as placas foram lavadas com PBS-T e, em seguida, adicionado 100uL/poço de imunoglobulina anti-IgG de cão conjugada com a peroxidase diluída a 1:5000 PBS-T com 0,05% de leite em pó desnatado. Após incubação de 30min a 37°C foram feitas 4 lavagens. A revelação foi feita com 0,5mg/mL de OPD (ortofenilenodiamina) em tampão citrato fosfato com 5,1pH durante 10min a 37°C. Em ambiente escuro e à temperatura ambiente interrompeu-se a reação com a adição de 50uL de HCL (ácido clorídrico) 3M por poço e procedeu-se de imediato à leitura. Os resultados foram obtidos com base na leitura da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro com filtro de 492 nm (Figura 17, página 36).



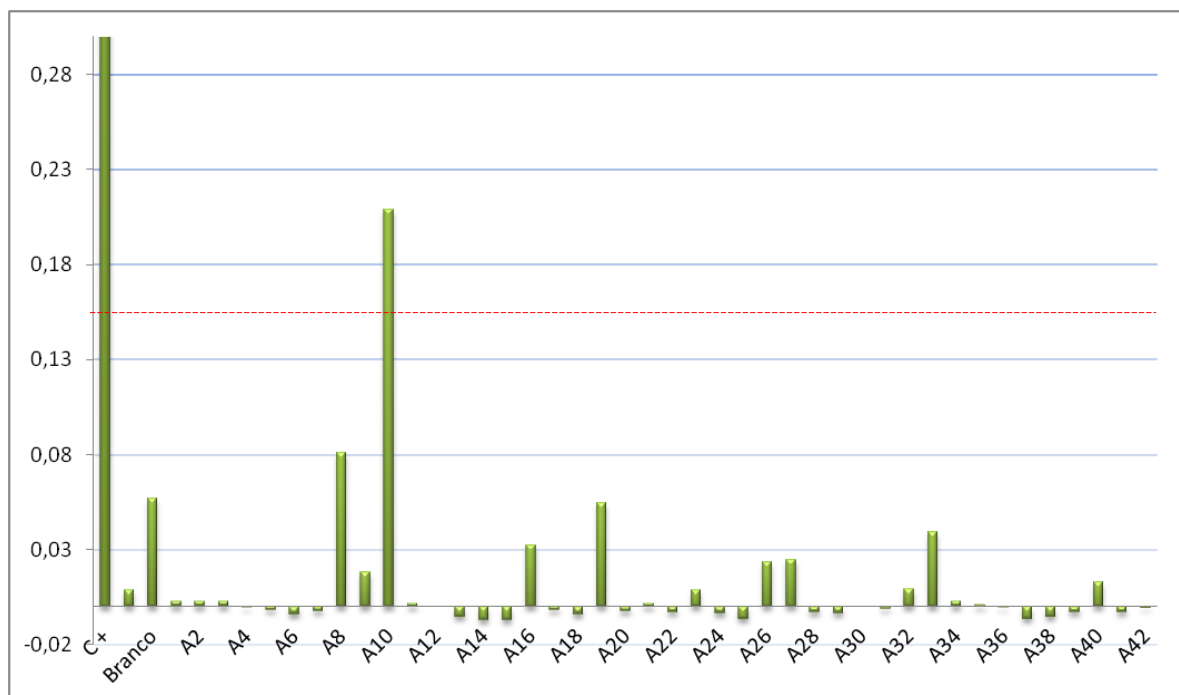
**Figura 17.** Método ELISA indireto (Adaptado de Faulkner, 2010).

### 3.3.RESULTADOS

Das 42 amostras testadas para a presença de anticorpos IgG anti-leishmania, apenas uma (A10) foi considerada positiva (2,4%) por apresentar uma densidade ótica (DO) 0,053 acima do cut-off proposto de 0.156 (Tabela 3 e Figura 18).

**Tabela 3.** Resultados finais obtidos através da subtração da absorvância do branco à média de cada amostra (C+- Controlo Positivo; C- - Controlo Negativo; Branco – Branco do Substrato; A – Amostra).

C +	C -	Branco	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
1,065	0,0085	0,057	0,0025	0,0025	0,0025	-0,0005	-0,002	-0,004	-0,0025	0,081	0,018
A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21
0,209	0,0015	0	-0,0055	-0,007	-0,007	0,032	-0,002	-0,004	0,0545	-0,0025	0,0015
A22	A23	A24	A25	A26	A27	A28	A29	A30	A31	A32	A33
-0,003	0,0085	-0,0035	-0,0065	0,0235	0,0245	-0,003	-0,0035	0	-0,0015	0,009	0,039
A34	A35	A36	A37	A38	A39	A40	A41	A42			
0,0025	0,001	-0,0005	-0,0065	-0,0055	-0,003	0,013	-0,003	-0,001			



**Figura 18.** Resultados Finais (Linha vermelha- cut-off=0,156).

### 3.4. DISCUSSÃO

No presente trabalho estudou-se o papel do Lobo Ibérico como reservatório para *Leishmania* recorrendo à deteção de anticorpos IgG anti-leishmania através do método ELISA.

Após análise dos resultados apenas a amostra 10 teve DO 0,053 acima do cut-off proposto de 0.156, conforme se pode observar na Figura 18, página 37, podendo, portanto, ser considerada positiva, uma vez que segundo Santarém, *et al* (2010) as amostras com absorvância maior ou igual ao valor do cut-off devem ser inicialmente consideradas reativas, e a amostra deverá ser repetida em duplicado antes da avaliação final. Se em uma das repetições se mantiver o resultado, deverá ser utilizado outro método de confirmação, no entanto não foi possível a realização da comprovação, ficando a veracidade da reação por apurar.

Assim, podemos apresentar dois cenários possíveis: (1) amostra reativa que após novo teste continua a ser reativa; (2) amostra inicialmente reativa que após novo teste não apresenta qualquer tipo de reatividade.

A elevada proximidade do controlo positivo com a única amostra positiva sugere a ocorrência de alguma contaminação originando, assim um falso positivo, visto o método utilizado ser muito suscetível a erros, nomeadamente de pipetagem (Moreira *et al*, 2011). No entanto são dois cenários hipotéticos que carecem de confirmação, sendo que mais estudos necessitam de ser realizados (Dalit *et al.*, 2010).

Contudo, em estudos anteriores (Satre *et al*, 2008), foram descobertas três amostras positivas para *L. infantum* em lobos da mesma região em estudo. Apesar de se desconhecer o local de infeção dos três lobos positivos visto terem sido permutados entre várias instituições antes do diagnóstico da patologia, tais factos comprovam a existência do parasita em lobos em Portugal, salientando, assim, a necessidade da implementação de programas de vigilância desta zoonose nesta espécie de modo a evitar a disseminação da mesma através da realização de novos estudos. Também estudos em Espanha aferiram a presença do parasita em elevadas proporções em carnívoros selvagens, mesmo em zonas não endémicas. A prevalência da infeção indica a existência de infeção em populações de carnívoros selvagens, aparentemente saudáveis, e os resultados são sugestivos de um ciclo silvestre independente dos canídeos domésticos (Sobrinho *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos são particularmente interessantes, uma vez que *L. infantum* está descrita em várias regiões de Portugal, com prevalências que variam entre 3,9-21,3% (OnLeish, s/d). A reduzida ocorrência de *L. infantum* no presente estudo em Lobo Ibérico comparativamente aos dados de cães do país pode traduzir quer uma reduzida circulação da doença na região em questão, ou uma menor suscetibilidade deste animal à doença.

Almeida *et al.*, (2011) reforça a importância dos canídeos silvestres no ciclo de transmissão em ambiente silvestre e em cativeiro. Mais estudos deveriam ser realizados para avaliar a prevalência do parasita no *Canis lupus signatus*, pois não só seriam vantajosos do ponto de vista de saúde veterinária e pública como também poderiam melhorar a compreensão do ciclo silvestre e sua relação com o ciclo doméstico (Del Río *et al.*, 2013).

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A Leishmaniose apresentou uma clara tendência de expansão geográfica nas últimas décadas. Fatores como alterações climáticas, a implantação de projetos agroindustriais, o rápido crescimento urbano agravado e uma progressiva deterioração das condições socioeconómicas têm sido citados como responsáveis pela expansão e reemergência da Leishmaniose em vários países.

Sendo a Leishmaniose uma zoonose emergente de carácter importante na Saúde Pública e a presença do parasita e da doença em território português uma realidade incontornável, é necessário enfatizar a necessidade da implementação de medidas preventivas que evitem a transmissão/propagação da doença ao homem, bem como a investigação de todos e quaisquer reservatórios silvestres que possam contribuir para a expansão da distribuição não só da Leishmaniose, como também de outros agentes patogénicos. À semelhança com o que se verifica noutros países os animais errantes/silvestres representam um papel cada vez mais demarcado na propagação de várias doenças quer ao Homem quer aos nossos animais de estimação.

Lobo Ibérico é dos principais protagonistas da fauna silvestre em Portugal e a sua proximidade filogenética com a espécie canina justifica que se pesquise a possibilidade do mesmo funcionar como reservatório de diferentes espécies do género *Leishmania*.

Conclui-se, após a realização deste estudo e da bibliografia consultada, a necessidade de estudos adicionais para avaliar a importância do Lobo Ibérico na transmissão e propagação da Leishmaniose.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**ACHLI. (2011).** Disponível em <http://www.loboiberico.org/pt>. Acedido em 23 de Outubro de 2013.

**Adamama-Moraitou KK, Rallis TS, Koytinas AF, Tontis D, Plevraki K, Kritsepi M (2007).** Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, **76(1)**: 53-57.

**Almeida A, Jesus de Paula D, Colodel E, Dutra V, Nakazato L, Sousa V (2011).** Visceral leishmaniasis and infectious hepatitis in bush dog from captivity in Brazil – Report of case. *Ciências Agrárias*. **32**: 333-338.

**Álvares F (2011).** Ecologia e conservação do lobo (*Canis lupus*, L.) no Noroeste de Portugal. *Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa*.

**Álvares F (2004).** Status and Conservation of the Iberian Wolf in Portugal. *WolfPrint*. **20**.

**Álvares F & Primavera P (2004).** The Wolf in Rural Communities' Culture in the North of Portugal. *WolfPrint*. **20**.

**Álvares F, Pereira E, Petrucci-Fonseca F (2000).** O Lobo no Parque Internacional Gerês-Xurê. Situação Populacional, Aspectos Ecológicos e Perspectivas de Conservação. *Galemys* **12**: 223-239.

**Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F (2007).** *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*. **64**: 1-109.

**Bengis RG, Leighton FA, Fischer JR, Artois M, Mörner T, Tate CM (2004).** The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Scientific and Technical Review Office International des Epizooties*. **23 (2)**: 497-511.

**Bianciardi P, Fasanella A, Manzillo VF, Trotta T, Pagano A, Sorino S (2004).** The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. *Parasitology Research*. **93**: 486-492.

**Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadoré JL, Bourdoiseau G (2001).** Review: Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal*. **162**: 108-120.

**Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, Petersen CA (2011).** Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis*. **5(4)**.

**Boitani L (2000).** Action Plan for the Conservation of the wolves (*Canis lupus*) in Europe. *Nature and Environment*. **113**.

**Cabral MJ, Almeida J, Almeida PR, Dellinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira ME, Palmeirim JM, Queiroz AI, Rogado L, Santos-Reis M (2006).** Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (2ª ed.). Lisboa. *Instituto da Conservação da Natureza*. Assírio & Alvim.

**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). Madrid. McGraw-Hill Interamericana: 651-665

**Cândido AT & Petrucci-Fonseca FR (2000).** O Lobo da Serra da Estrela: Passado, Presente e Futuro. *Galemys* **12**: 209-222.

**Cardoso L, Rodrigues M, Santos H, Schoone GJ, Carreta P, Varejão E, Benthem BV, Afonso MO, Pires CA, Semião-Santos SJ, Rodrigues J, Schallig HD, 2004.** Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Vet. Parasitol.* **121 (1-2)**: 21-32.

**Carreira MA (2010).** Contribuição para o Estudo da Ecologia do Lobo Ibérico no Distrito de Vila Real. *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa: Mestrado em Biologia da Conservação*.

**Carreira RS & Petrucci-Fonseca F (2000).** Lobo na Região Oeste de Trás-os-Montes (Portugal). *Galemys* **12**: 123-134.

**Cavaliere T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P (1999).** Clinical, serological and parasitologic follow-up after long term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **13**: 330-334.

**Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M (2007).** Visceral Leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature Reviews – Microbiology*. **5**: 873-882.

**Ciaramella P, Corona S (2003).** Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. **25**: 358-368.

**Corrales GM (2005).** Leishmaniosis Canina: Manejo clínico de la leishmaniosis canina: podemos unificar criterios?. *Informacion Veterinaria*. **8**: 44-48.

**Cortese L, Pelagalli A, Piantedosi D, Mastellone V, Di Loria A, Lombardi P (2007).** The effects of prednisone on haemostasis in leishmaniotic dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal*.

**Costa CH (2011).** How effective is the dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **44 (2)**: 232-242.

**Costa CM (2010).** Ação depredatória do lobo (*Canis lupus signatus*) na área de influência do Parque Natural do Alvão no período 2005-2006: Análise dos ataques e espécies atacadas. *Dissertação do 2º Ciclo de Estudos em Eng. Zootécnica*.

**Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linardi PM (2005).** Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. **128**: 149–155

**Dantas-Torres F, Paiva-Cavalcanti M, Figueiredo LA, Melo MF, Silva FJ, Silva AL, Almeida EL, Brandão-Filho SP (2010).** Cutaneous and visceral

leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*. **170**: 313-317.

**Dalit T, Kedem-Vaanunu N, King R, Bar-Gal G, Edery N, Jaffe C (2010).** Leishmania tropica, Infection in Golden Jackals and Red Foxes. *Emerging Infectious Diseases*. Israel.**16**: 1973-1975.

**De Freitas E, Melo MN, Da Costa-Val AP, Michalick MS (2006).** Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*. **137(1-2)**:159-167.

**Del Río L, Chitimia L, Cubas A, De la Rúa P, Gerrikagoitia X, Barral M et al (2013).** Evidence for widespread Leishmania infantum infection. *PREVET*: 1-6.

**Desjeux P (2004).** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. **27**: 305-318.

**Eggermann J, Costa GF, Guerra AM, Kirchner W, Petrucci-Fonseca F (2010).** Presence of Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in relation to land cover, livestock and human influence in Portugal. *Mammalian Biology*.

**Elliott J, Grauer GF (2007).** BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology (2<sup>nd</sup> edition). BSAVA – British Small Animal Veterinary Association: 8-25; 231-238.

**Espirito-Santo C & Petrucci-Fonseca F (2004).** Human Dimensions in Iberian Wolf Management in Portugal. *WolfPrint*. **20**.

**Faulkner A. (2010).** ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

**Giménez AA, Menéndez NC (2005).** Leishmaniosis canina: modelos radiográficos de las lesiones óseas y articulares en la leishmaniosis canina. *Información Veterinaria: Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España*. **8**: 34-38. Disponível em: [www.colvet.es](http://www.colvet.es)

**Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FG, Alves LC (2008).** Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*. **175**: 45-52.

**Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG (2007).** Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *The Veterinary Journal*.

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

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

**Grilo C, Moço G, Cândido AT, Alexandre AS, Petrucci-Fonseca F (2002).** Challenges for the recovery of the Iberian Wolf in the Douro river south region. *Revista de Biol.* **20**: 121-133.

**Grilo C, Roque S, Rio-Maior H, Petrucci-Fonseca F (2004).** The Isolated Wolf Population South of the Douro River: Status and action priorities for its recovery. *WolfPrint*.

**ICN. (2006).** Fauna, Mamíferos. *Plano Sectorial da Rede Natura 2000*.

**Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K (2004).** Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases*. **10-12**: 2067-72.

**Lobo, G. (2009).** Disponível em [http://lobo.fc.ul.pt/?page=conteudos/cr\\_lobo\\_iberico](http://lobo.fc.ul.pt/?page=conteudos/cr_lobo_iberico). Acedido a 23 de Outubro de 2013.

**Maia CA (2005).** Diagnóstico laboratorial da leishmaniose canina. *Veterinária Técnica*.

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

**Maia C, Cristovão JM, Ramada J, Rolão N, Campino L (2006).** Diagnóstico da leishmaniose canina pela técnica de PCR aplicada a sangue periférico em papéis de filtro-resultados preliminares. *Vet.Med.* **47**: 29-33.

**Moreira L (1998).** *O Lobo, Património Natural Transmontano.*

**Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD (2007).** Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology.* **145:** 245-252.

**Moreira R, Capela I, Mesquita J, Nóbrega C, Vala, H (2011).** Método de Elisa e as suas aplicações em diagnóstico. *2º Congresso Internacional de Enfermagem Veterinária.* Viana do Castelo.

**Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM (2012).** PLoS Neglected Tropical Diseases. *Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs.* **6:** 1-7.

**Nunes AM (2000).** O Lobo Ibérico em Portugal. *Signatus Newsletter .*

**OnLeish** s/d. Epidemiologia. Leishmaniose Canina. Observatório Português das Leishmanioses. Disponível em <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>

**Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C et al. (2007).** Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennel dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology.* **144:** 270-278.

**Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U (2001):** Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc.* **219(8):**1076-1083.

**Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TM, Paixao TA, Costa LF, Dengues EG, Diaz AA, Santos RL (2009).** Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet Parasitol* **165(3-4):**327-331.

**Palatnick-de-Sousa CB (2008).** Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*. **26**: 1709-1724.

**Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E, (2010).** Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **236**: 1184 – 1191.

**Pennisi MG, De Majo D, Masucci M, Britti D, Vitale F, Del Maso R (2005).** Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniasis with a combination of metronidazole and spiramicin. *The Veterinary Record*. **156**: 346-249.

**Petrucci-Fonseca F. (1990).** O lobo (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907) em Portugal. Problemática da sua conservação. *Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa para a obtenção do grau de Doutor*. Lisboa, 392.

**Queiroz AI, Alves PC, Barroso I, Beja P, Fernandes M, Freitas L et al. (2005).** *Canis lupus*, Lobo-ibérico. In Cabral et al., *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal* (p. Instituto da Conservação da Natureza). Lisboa.

**Ramalho S (2012).** Esteve apresenta Leisguard. *Veterinária Actual*.

**Ribeiro S & Petrucci-Fonseca F (2004).** Recovering the use of Livestock Guarding Dog. *WolfPrint*. **20**.

**Rolão, N., Martins, M.J., João, A., Campino, L. (2005).** Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, **12**, 183-186

**Rosa R, Marques C, Rodrigues OR, Santos-Gomes GR (2007).** Immunization with *Leishmania infantum* released proteins confers partial protection against parasite infection with a predominant Th1 specific immune response. *Vaccine*. **25**: 4525-4532.

**Rosypal AC, Zajac AM, Lindsay DS (2003).** Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*. **33**: 921-937.

**Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS (2005).** Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol*, **91(4)**:970-972.

**Santarém N, Silvestre R, Cardoso L, Schallig H, Reed SG, Cordeiro-da-Silva A (2010).** Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. **48(5)**: 1866-1874.

**Santarém N, Tomás A, Ouaiissi A, Tavares J, Ferreira N, Manso A et al. (2005).** Antibodies against a *Leishmania infantum* peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of visceral leishmaniasis and for monitoring the efficacy of treatment. *Immunol Lett*. **101**: 18– 23.

**Satre N, Francino O, Ensenat C, Ramirez O, Sánchez A, Altet L (2008).** Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Veterinary Parasitology*. **158**:117–120.

**Sauquillo MC (2005).** Leishmaniosis canina: Manifestaciones oculares en la leishmaniosis canina. *Información Veterinaria: Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España*, **8**: 39-43. Disponível em: [www.colvet.es](http://www.colvet.es)

**Schimming BC & Pinto e Silva JR (2012).** Canine leishmania Infections - Review. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. **19**.

**Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL (2009):** Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. **160(1-2)**:55-59.

**Singh S, Dey A, Sivakumar R (2005).** Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. **5**: 251-265.

**SNPRCN (1990).** *Mamíferos, Aves, Répteis e Anfíbios. Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*. 1: Lisboa.

**Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M et al. (2008).** Characterization of widespread canine leishmaniasis among. *Veterinary Parasitology*. **155**: 198–203.

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

**Sun HX, Xie Y, Ye YP (2009).** Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*. **27**: 1787–1796.

**Tabar MD, Roura X, Francino O, Altet L, Ruiz de Gopegui R (2008).** Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *J Small Anim Pract*. **49(7)**:325-328.

**Távora MP, Pereira MA, Silva VL, Vita GF (2007).** Estudo de validação comparativo entre as técnicas ELISA e RIFI para diagnosticar *Leishmania sp* em cães errantes apreendidos no município de Campo dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **40(4)**: 182-483.

**Tizard I (2009).** *Imunologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier. (8ª Edição): 587.

**Virbac. (2011).** *Animal Health, Canileish®: Technical Product Profile*.

**Vouldoukis I, Rougier S, Dugas B, Pino P, Mazier D, Woehrlé F (2006).** Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology*. **135**: 137-146.

**Weese JS & Fulford M (2011).** "Companion animal zoonoses". Wiley – Blackwell: 40- 46.

**Weinhold B (2003)** "Conservation Medicine" *Environmental Health Perspectives*. **111**: 525-529

**WHO (2013).** World Health Statistics. Disponível em [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2013/en/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2013/en/)