



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Sofia Homem de Noronha Alves

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Abordagem farmacológica à leishmaniose canina”, sob orientação da Dra. Mónica Climente Martí, da Dra. Cláudia Sofia Fernandes Barros, da Dra. Ana Cláudia Felisberto e da Professora Doutora Vânia Maria Antunes Moreira Bimbo, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

**Sofia Homem de Noronha Alves**

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Abordagem farmacológica à leishmaniose canina”, sob orientação da Dra. Mónica Climente Martí, da Dra. Cláudia Sofia Fernandes Barros, da Dra. Ana Cláudia Felisberto e da Professora Doutora Vânia Maria Antunes Moreira Bimbo, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2022

Eu, Sofia Homem de Noronha Alves, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2015252034, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada: “Abordagem Farmacológica à Leishmaniose canina” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade do Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 03 de setembro de 2021

Sofia Homem de Noronha Alves

(Sofia Homem de Noronha Alves)

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Vânia Moreira, a quem devo grande parte desta conquista, pela sua tranquilidade, rapidez e acompanhamento ao longo destes meses.

À professora Doutora Isabel Vitória pela sua compreensão e disponibilidade.

À equipa do Hospital Universitário Dr. Peset de Valência, Dra. Mónica Climente, Dra. Oretto Ruiz Millo e a todos os Farmacêuticos Internos Residentes por me terem integrado e acompanhado ao longo dos três meses de estágio.

À equipa da Farmácia Barreiros do Porto, em especial à Dra. Cláudia Sofia Fernandes Barros pelas suas palavras, pela preocupação e pelo carinho.

À equipa da Farmácia Barral, Dra. Ana Cláudia Felisberto, Catarina Oliveira, Helena Coutinho, Filipa Cordeiro, Inês Pereira, Inês Martins, João Estarreja, Catarina Rodrigues, Joana Soares e Clarinda Ramos, pela compreensão, apoio e motivação ao longo do estágio e por me terem proporcionado os melhores momentos em Lisboa.

À minha família, Pai, Mãe e Irmã, pelo apoio incondicional, pela compreensão, pelas palavras em todos os momentos mais difíceis, por nunca me terem deixado desistir e por me terem acompanhado sempre ao longo destes cinco anos. A vocês devo-vos tudo.

Aos meus colegas de casa de Valência, Nina Lap, Noa Kooiman, Max Galbe, Tom Bongers, Ilse Lankheet. com quem partilhei os melhores momentos de Erasmus e que vão ficar para sempre no meu coração,

Aos meus amigos, Karol Serrano, Giuseppe Ricciardi, Rafael Cunha e Sara Coelho que contribuíram para que estes três meses de Erasmus se tornassem numa das melhores experiências da minha vida.

À Sílvia, Mariana, Filipa, Carolina e Isa, que tornaram estes cinco anos inesquecíveis.

À minha madrinha, Jéssica Oliveira, por me ter facultado grande parte dos apontamentos que me “salvaram” ao longo do curso.

À Filipa Ferreira por ser o meu lembrete de informações importantes e por me ter ajudado sempre que precisei

Ao Victor Hansen pelo apoio, disponibilidade e compreensão que demonstrou ao longo destes meses

A Coimbra, pelas tradições, pelos ensinamentos e memórias que levarei comigo para o resto da vida.

## ÍNDICE

### PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. ANÁLISE SWOT.....	12
2.1. PONTOS FORTES ( <i>STRENGTHS</i> ).....	12
2.1.1. Equipa de trabalho.....	12
2.1.2. Comunicação e contato com a realidade noutra país.....	12
2.1.3. Organização das unidades dos Serviços Farmacêuticos no HUDP.....	13
2.2. PONTOS FRACOS ( <i>WEAKNESSES</i> ).....	13
2.2.1. Permanência de curta duração em determinadas unidades.....	13
2.2.2. Falta de acesso aos <i>softwares</i> por parte dos estagiários.....	14
2.3. OPORTUNIDADES ( <i>OPPORTUNITIES</i> ).....	14
2.3.1. Rotação pelos diferentes Serviços Farmacêuticos.....	14
2.3.1.1. Unidade de Gestão de Medicamentos.....	14
2.3.1.2. Unidade de Farmacotecnia.....	15
2.3.1.3. Unidade de Intervenção Farmacêutica a Pacientes Externos..	15
2.3.1.4. Unidade de Farmacocinética Clínica.....	16
2.3.1.5. Unidade de Terapia Parenteral.....	16
2.3.1.6. Sistema Integral de Dispensação Individualizada de medicamentos em doses unitárias.....	18
2.3.2. Preparação automatizada de citotóxicos.....	18
2.3.3. Valor profissional e formação contínua.....	19
2.4. AMEAÇAS ( <i>THREATS</i> ).....	19
2.4.1. Pouca preparação prática.....	19
2.5. CASOS PRÁTICOS.....	20
2.5.1. Leucemia Linfocítica Crónica.....	20
2.5.2. Cancro colorretal estágio IV.....	21

### PARTE II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária na Farmácia Barreiros no Porto

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. ANÁLISE SWOT.....	24
2.1. PONTOS FORTES ( <i>STRENGTHS</i> ).....	24
2.1.1. Espaço e organização da farmácia.....	24

2.1.2. Equipa de trabalho.....	25
2.2. PONTOS FRACOS ( <i>WEAKNESSES</i> ).....	25
2.3. OPORTUNIDADES ( <i>OPPORTUNITIES</i> ).....	26
2.3.1. Experiência laboratorial.....	26
2.4. AMEAÇAS ( <i>THREATS</i> ).....	26
2.5. CASOS PRÁTICOS.....	26
2.5.1. Preparação de uma suspensão oral de trimetoprim a 1% (m/V) com aroma de banana.....	26

### **PARTE III – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária na Farmácia Barral em Lisboa**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. ANÁLISE SWOT.....	31
2.1. PONTOS FORTES ( <i>STRENGTHS</i> ).....	31
2.1.1. Equipa de trabalho.....	31
2.1.2. Vasta gama de produtos.....	31
2.2. PONTOS FRACOS ( <i>WEAKNESSES</i> ).....	32
2.2.1. Utentes.....	32
2.3. OPORTUNIDADES ( <i>OPPORTUNITIES</i> ).....	32
2.3.1. Aquisição de competências e aperfeiçoamento de conhecimentos do ponto de vista farmacêutico.....	32
2.4. AMEAÇAS ( <i>THREATS</i> ).....	33
2.4.1. Poucos funcionários.....	33
2.5. CASOS PRÁTICOS.....	33
2.5.1. Detecção de erro numa receita eletrónica prescrita erradamente para um bebé de 2 anos.....	33
2.5.2. Caso de cistite.....	34

### **PARTE IV – Monografia intitulada “Abordagem farmacológica à Leishmaniose canina”**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	36
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	38
ABSTRACT.....	40
RESUMO.....	41

1. INTRODUÇÃO.....	42
2. TRANSMISSÃO.....	44
2.1. Ciclo de vida do parasita.....	44
3. PREVENÇÃO.....	45
3.1. Inseticidas e repelentes.....	45
3.1.1. Piretróides.....	46
3.1.2. Neonicotinóides.....	47
3.1.3. Hormonas Juvenis análogas.....	47
3.1.4. Fenilpirazóis.....	48
3.2. Prevenção Imunoprofilática.....	48
3.2.1. Vacinas comercializadas em Portugal.....	50
3.2.1.1. Canileish®.....	50
3.2.1.2. Letifend®.....	51
3.2.1.3. <i>Knockout</i> do gene p27 de <i>Leishmania major</i> como candidata a vacina viva atenuada.....	51
4. DIAGNÓSTICO.....	58
4.1. Sinais e sintomas.....	58
4.2. Abordagem clínica do diagnóstico.....	60
5. TRATAMENTO.....	62
5.1. Limitações do tratamento atual contra LCan.....	62
5.2. Fármacos anti- <i>Leishmania</i> .....	63
5.2.1. Análogos de purinas.....	63
5.2.1.1. Alopurinol.....	63
5.2.2. Compostos de antimónio.....	64
5.2.2.1. Antimoniato de Meglumina e Estibogluconato de Sódio.....	64
5.2.3. Derivados de Alquilfosfocolina.....	65
5.2.3.1. Miltefosina.....	65
5.2.4. Anfotericina B.....	65
5.2.5. Aminosidina.....	66
5.2.6. Fluoroquinolonas.....	67
5.2.6.1. Marbofloxacina.....	67
5.2.7. Domperidona.....	67
5.3. Combinação de fármacos.....	68
5.4. Aromatecinas sintéticas.....	68
5.5. Derivados de Chalconas.....	72



6. CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82



## **PARTE I**

### **Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar no Hospital Universitário Doutor Peset**

Sob orientação da Dra. Mónica Climente Martí

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

<b>DU_SIDIM</b>	Sistema Integral de Dispensação Individualizada de Medicamentos em Doses Unitárias
<b>EPI</b>	Equipamento de Proteção Individual
<b>FCC</b>	Unidade de Farmacocinética
<b>FCT</b>	Unidade de Intervenção Farmacêutica a Pacientes Externos
<b>FIR</b>	Farmacêutico Interno Adjunto
<b>GI</b>	Gastrointestinal
<b>HUDP</b>	Hospital Universitário Doutor Peset
<b>IV</b>	Intravenosa
<b>MICF</b>	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
<b>NPC</b>	Nutrição Parentérica para Doentes Críticos
<b>NPH</b>	Nutrição Parentérica Hipocalórica
<b>NPT</b>	Nutrição Parentérica Total
<b>PNT</b>	Protocolos Normalizados de Trabalho
<b>SF</b>	Serviços Farmacêuticos
<b>UC</b>	Universidade de Coimbra
<b>UF</b>	Unidades Funcionais
<b>UFPE</b>	Unidade de Intervenção Farmacêutica a Pacientes Externos
<b>UGM</b>	Unidade de Gestão de Medicamentos
<b>UTP</b>	Unidade de Terapia Parenteral

## I. INTRODUÇÃO

Este relatório foi redigido no âmbito da unidade curricular Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Coimbra.

Após a realização deste estágio é notória a incidência que as unidades curriculares ao longo do curso têm para a componente teórica, sendo que grande parte das aulas práticas acabam por ficar um pouco aquém da realidade profissional. Assim sendo, cabe-nos a nós estudantes ser proativos na nossa própria formação, tentar ao máximo aproveitar as oportunidades que nos surgem e ir em busca de experiências que nos enriqueçam a nível profissional.

O contacto com diferentes áreas do ramo farmacêutico permite-nos desenvolver conhecimentos práticos para que possamos exercer a nossa profissão em qualquer uma das saídas profissionais que o curso em Ciências Farmacêuticas nos oferece. Sendo o estágio em farmácia hospitalar de caráter não obrigatório, a minha escolha teve como principal objetivo conhecer a importância que um farmacêutico tem no meio hospitalar, as suas funções e respetivas responsabilidades.

O estágio curricular foi realizado no Hospital Universitário Dr. Peset (HUDP) localizado no Bairro de Patraix na cidade de Valência, sob a orientação da Dra. Mónica Climente Martí e teve a duração de 3 meses, tendo se iniciado no dia 15 de outubro e finalizado no dia 15 de dezembro de 2021.

O HUDP é um hospital público e foi considerado o primeiro hospital da Segurança Social da Comunidade Valenciana. O seu funcionamento como Hospital Geral teve início em 1951, com a denominação de “Residencia Sanitaria General Sanjurjo”, e em 1989 foi adotado o nome de Hospital Doutor Peset em homenagem ao médico Joan Bautista Peset Aleixandre. Atualmente o HUDP possui 26 centros de saúde e consultórios, 16 Unidades Hospitalares e ainda uma Unidade de Hospitalização Domiciliária, sendo considerado um hospital de referência para toda a comunidade.

## **2. ANÁLISE SWOT**

### **2.1. PONTOS FORTES (STRENGTHS)**

#### **2.1.1. Equipa de trabalho**

Um dos pontos fortes deste estágio foi sem dúvida o espírito de equipa e a disponibilidade que todos demonstraram desde o meu primeiro dia no hospital.

No ambiente hospitalar todos os dias são uma corrida contra o tempo, pois as validações das prescrições pelos farmacêuticos têm de ser feitas rapidamente para que os enfermeiros consigam preparar a medicação e, conseqüentemente esta esteja disponível quando o doente chega ao hospital. O espírito de equipa que existe em cada unidade e a boa relação que todos os profissionais mantêm uns com os outros permite que este circuito seja feito de forma rápida e harmoniosa.

A dedicação, responsabilidade e competência que os farmacêuticos depositam neste hospital é notável. Ainda que exista uma sobrecarga de tarefas a realizar, demonstraram-se sempre disponíveis para esclarecer as minhas dúvidas, explicar-me o funcionamento de todas as unidades, e ainda me deram a oportunidade de acompanhar alguns dos trabalhos executados por outros profissionais que integram este serviço.

Há também uma inter-relação muito próxima entre o farmacêutico e o médico conseguida através da utilização de um software, *Orion Clinic*<sup>®</sup>, que permite a troca de informação entre ambos de forma rápida e eficiente.

#### **2.1.2. Comunicação e contacto com a realidade noutro país**

O facto de ter optado por realizar este estágio em Espanha foi muito enriquecedor do ponto de vista profissional e pessoal, pois permitiu-me contactar com uma nova realidade, tanto a nível de formação dos farmacêuticos, como no seu exercício profissional. Por outro lado, permitiu-me conhecer pessoas de muitos países diferentes o que é sempre uma mais-valia a nível cultural, mas também uma boa oportunidade para pôr em prática outras línguas, neste caso o espanhol e o inglês.

A formação dos farmacêuticos hospitalares em Espanha difere um pouco da realidade em Portugal, uma vez que é necessário realizar uma prova a nível nacional. Do ponto de vista profissional, também existem algumas diferenças, como por exemplo, o facto da preparação da medicação ser feita por enfermeiros e não por técnicos de farmácia como acontece na maioria dos hospitais portugueses.

### **2.1.3. Organização das unidades dos Serviços Farmacêuticos (SF) no HUDP**

Na minha opinião, as unidades dos SF no HUDP estão muito bem organizadas, uma vez que proporcionam a comunicação próxima entre diferentes profissionais de saúde e ainda permitem que cada farmacêutico se dedique somente a uma área específica, contribuindo para uma maior rapidez de resposta às necessidades de cada doente. Os SF do HUDP englobam onze Unidades Funcionais (UF):

- **UF1.** Unidade de Farmacotecnia
- **UF2.** Unidade de Consultoria e Qualidade Farmacoterapêutica
- **UF3.** Unidade de Farmacocinética (FCC)
- **UF4.** Unidade de Atenção Farmacêutica a Pacientes Externos (UFPE)
- **UF5.** Unidade de Gestão de Medicamentos (UGM)
- **UF6.** Unidade de Produtos de Investigação (Ensaio Clínicos)
- **UF7.** Serviço Farmacêutico de Atenção Primária
- **UF8.** Sistema Integral de Dispensação Individualizada de medicamentos em doses unitárias (DU\_SIDIM)
- **UF9.** Unidade de Terapia Parenteral (UTP) (Unidade de Oncologia Farmacêutica)
- **UF10.** Unidade de Docência e Investigação Clínica
- **UF11.** Unidade de Coordenação de Processos Farmacoterapêuticos Integrados

Apesar de, como disse anteriormente, cada farmacêutico se dedicar somente a uma área específica, durante os 4 anos de formação os Farmacêuticos Internos Residentes (FIR) têm a oportunidade de fazer rotação por todas as unidades.

## **2.2. PONTOS FRACOS (WEAKNESSES)**

### **2.2.1. Permanência de curta duração em determinadas unidades**

O estágio foi organizado de forma que na primeira semana houvesse uma rotação por todas as unidades do serviço, antes de ser destacada para a unidade de terapia parenteral.

A unidade onde fiquei exige um cuidado acrescido, não só relativamente à preparação da medicação que tem de ser preparada em condições assépticas, como também pelo facto de estarmos perante doenças graves e, portanto, de responsabilidade acrescida. Nesse sentido, grande parte do meu estágio baseou-se na organização da medicação no armazém desta unidade, atualização dos códigos nacionais, elaboração de etiquetas e verificação de prazos de validade.

Considero que teria sido importante permanecer mais tempo em cada um dos setores, para conseguir perceber melhor a sua organização, os profissionais de saúde que os integram, as suas respetivas funções e para poder acompanhar melhor o trabalho dos farmacêuticos no dia-a-dia.

### **2.2.2. Falta de acesso aos softwares por parte dos estagiários**

No HUDP são utilizados *softwares* clínicos pelos profissionais de saúde que permitem fazer o acompanhamento do doente, ter acesso à história clínica do mesmo e ainda fazer a validação das prescrições. Durante o meu período de estágio, sempre que houve necessidade de utilizar esses *softwares*, destaco o *Orion clinic*<sup>®</sup> e o *Farmis\_Oncofarm*<sup>®</sup>, tive que pedir o nome de usuário e contrassenha a outros farmacêuticos, uma vez que os dados que me foram atribuídos para aceder a estas plataformas no início de estágio, não me davam acesso a toda a informação que necessitava.

Por outro lado, estas plataformas não podem ser usadas por dois utilizadores diferentes, fazendo com que se encerrassem automaticamente sempre que outro farmacêutico necessitava de a consultar.

## **2.3. OPORTUNIDADES (OPPORTUNITIES)**

### **2.3.1. Rotação pelos diferentes Serviços Farmacêuticos**

Durante a primeira semana foi-me dada a oportunidade de fazer uma rotação por algumas das diferentes Unidades Funcionais:

<b>Dia 15 de Outubro</b>	<b>Dia 16 de Outubro</b>	<b>Dia 17 de Outubro</b>	<b>Dia 20 de Outubro</b>
UGM/FCT	UFPE/FCC	UTP	DU_SIDIM

#### **2.3.1.1. Unidade de Gestão de Medicamentos (UGM)**

A UGM tem como principal objetivo garantir a disponibilidade dos medicamentos em todo o hospital, de forma a responder às necessidades dos pacientes e dos demais profissionais de saúde de forma rápida e eficiente. Para isso o farmacêutico deve assegurar que estes são adquiridos, recebidos, distribuídos e dispensados de forma correta.

Nesta UF o farmacêutico é também responsável pela verificação do *stock* e por controlar os estupefacientes e psicotrópicos, desde a sua aquisição, até a sua dispensação e

posterior reposição. Estes medicamentos são armazenados num sistema automático designado por *Omnicell*<sup>®</sup>, situado em diferentes unidades do hospital (cuidados intensivos, unidade de cirurgia e urgências) e o seu acesso só é permitido mediante a colocação de um código. Assim, este sistema não só garante uma maior segurança, uma vez que os medicamentos são dispensados em unidades individuais, como também nos dá atualizações automatizadas do *stock*, tornando todo este processo mais fácil e menos suscetível a erros.

### **2.3.1.2. Unidade de Farmacotecnia (FCT)**

A FCT é responsável pela formulação e manipulação de medicamentos em situações em que é necessário adaptar a dose ou a forma farmacêutica de um medicamento já comercializado, a fim de responder às necessidades específicas de cada doente.

Cabe aos profissionais de saúde desta unidade, a elaboração de fórmulas magistrais e preparados oficinais segundo os protocolos PNT (Protocolos Normalizados de Trabalho) onde constam as matérias-primas e material a ser utilizado, controlos de qualidade e modos de acondicionamento. Após cada preparação, estas são registadas e etiquetadas.

Na UF os farmacêuticos também são responsáveis pela validação de formas farmacêuticas recondicionadas pelos auxiliares, onde é verificado o princípio ativo, a dosagem, a caducidade e o lote.

### **2.3.1.3. Unidade de Intervenção Farmacêutica a Pacientes Externos (UFPE)**

A UFPE é a unidade onde se realizam as consultas a pacientes não hospitalizados. Nesta unidade o farmacêutico tem como principais funções: seguir, aconselhar, dispensar a medicação, explicar ao doente a forma correta de utilização da mesma, bem como informar sobre o possível surgimento de efeitos secundários. O farmacêutico deve garantir que o doente compreendeu a informação que lhe foi transmitida antes deste abandonar o consultório. Para além disso, quando um paciente inicia um tratamento novo é-lhe entregue uma ficha de informação onde consta toda a informação que o doente necessita para alcançar o sucesso terapêutico.

É nesta unidade que são dispensados os medicamentos de uso hospitalar, que requerem maior vigilância, e ainda os medicamentos de utilização *off-label*.

Durante a minha rotação por esta unidade, tive a oportunidade de contactar com doentes oncológicos, doentes infetados com HIV e mulheres a fazer terapêutica *in vitro* para engravidar.



#### **2.3.1.4. Unidade de Farmacocinética Clínica (FCC)**

A FCC dedica-se à individualização posológica e otimização dos tratamentos, com a finalidade de alcançar a máxima eficácia terapêutica, minimizando a incidência de efeitos adversos.

Nesta unidade são determinadas as concentrações de certos fármacos em fluidos biológicos (plasma e sangue), sobretudo de fármacos que apresentam uma margem terapêutica estreita e, portanto, maior risco de toxicidade, como é o caso de alguns imunossuppressores, antiepiléticos, antibióticos aminoglicosídeos e do glucósido cardiotónico, digoxina. Muitas vezes esta instabilidade é causada não só pela variabilidade genética do indivíduo e possível existência de polimorfismos, como também pelo facto do perfil farmacocinético de certos fármacos se alterar consoante as características físico-químicas e biológicas do mesmo.

É também da responsabilidade desta unidade funcional a determinação da concentração de fármacos, como antidepressivos e AINES, quando há suspeita de intoxicação, seja ela acidental ou voluntária.

A monitorização de fármacos no organismo permite que os regimes posológicos sejam mais seguros e individualizados e não baseados em decisões empíricas.

#### **2.3.1.5. Unidade de Terapia Parenteral (UTP)**

O acesso à UTP é bastante controlado uma vez que é nesta unidade que se prepara a medicação a ser administrada por via parenteral, inclusive citotóxicos, e por isso todos os profissionais que trabalham neste espaço têm de utilizar Equipamento de Proteção Individual (EPI). Para além disso, existe ainda um sistema de duas portas que previne a contaminação tanto para o interior como para o exterior desta unidade e, cujo seu funcionamento ocorre através de um bloqueio que impede que ambas as portas estejam simultaneamente abertas.

Esta unidade foi onde passei grande parte do meu estágio e aqui tive a possibilidade de contactar com vários profissionais desde auxiliares de enfermagem, enfermeiros, farmacêuticos residentes e farmacêuticos adjuntos. Os enfermeiros são os principais responsáveis pela preparação de medicamentos citotóxicos e outras preparações a serem administradas por via parentérica. Os auxiliares de enfermagem garantem o fluxo correto desta unidade e os farmacêuticos têm como principal função a validação dos tratamentos, antes de serem preparados e antes de serem dispensados.

Nesta unidade existem duas câmaras de fluxo:

- Câmara de fluxo laminar vertical: onde é preparada a medicação citotóxica e outras preparações que apresentam elevado risco de toxicidade para o manipulador, como por exemplo o antiviral Ganciclovir® utilizado no tratamento de infeções causadas por citomegalovirus.
- Câmara de fluxo laminar horizontal (sala branca): onde são preparados os produtos estéreis que não apresentam risco para o operador. Esta câmara funciona em condições assépticas e aqui são preparadas nutrições parentéricas, medicação administrada previamente à quimioterapia, colírios, determinados antibióticos, entre outros.

O funcionamento desta Unidade Funcional inicia-se com a prescrição feita pelo médico, que é posteriormente validada pelo farmacêutico. Nesta validação o farmacêutico tem de ter em conta vários parâmetros, desde parâmetros analíticos, bioquímicos, diagnóstico do doente e ainda o histórico de administrações. Após validação da prescrição, os auxiliares de enfermagem preparam o material que os enfermeiros necessitam para proceder à preparação da medicação. Preparada a medicação, esta é posteriormente colocada numa bandeja metálica por doente. De seguida, o farmacêutico faz nova validação para confirmar que a medicação que o doente necessita se encontra toda na bandeja e verifica também a caducidade, doses, princípio ativo e a presença de partículas em suspensão nas bolsas parenterais.

No caso das nutrições parentéricas, o farmacêutico deve calcular as necessidades energéticas do doente, verificar o estado funcional do trato GI e do sistema renal e analisar se a prescrição está ou não conforme, ou se é necessário fazer ajuste de doses. Dentro da nutrição parentérica temos:

- Nutrição Parentérica Hipocalórica (NHP): O aporte calórico deste tipo de nutrição varia entre 1000 e 1800 Kcal e utiliza-se apenas como suplemento quando a ingestão de nutrientes por parte do doente não é suficiente.
- Nutrição Parentérica Total (NPT): Esta preparação é utilizada em situações em que a via entérica está totalmente comprometida. É constituída por hidratos de carbono, lípidos e proteínas e a via de administração utilizada é a via IV central devido à elevada osmolaridade desta preparação.
- Nutrição Parentérica para doentes críticos: De maior aporte calórico pois normalmente estes doentes estão em estado de anorexia.

### **2.3.1.6. Sistema Integral de Dispensação Individualizada de medicamentos em Doses Unitárias (DU\_SIDIM)**

A DU\_SIDIM é responsável pela dispensação dos medicamentos em doses unitárias aos doentes que se encontram hospitalizados e esta dispensação ocorre em três turnos (manhã, tarde e noite), o que permite que a medicação vá sendo adaptada conforme a evolução clínica do doente. Esta adaptação pode ser feita através de alterações no regime terapêutico do doente, como também através de ajuste de doses, por exemplo, quando há alterações no valor da creatinina.

Nesta unidade funcional ocorre um seguimento contínuo da evolução clínica do doente durante o tempo em que este está ingressado, a fim de melhorar a qualidade dos tratamentos, uma vez que todas as suspensões e alterações que são feitas na medicação do doente têm de ser validadas, contribuindo também para um maior controlo e menor surgimento de erros.

Antes da medicação ser dispensada, todas as prescrições são validadas através de um *software* designado por *Orion Clinic*<sup>®</sup>, onde o farmacêutico e o médico estão em contacto para discutir cada caso e eventuais erros, ou dúvidas que surjam no regime terapêutico do doente.

### **2.3.2. Preparação automatizada de citotóxicos**

Na UTP tive a oportunidade de acompanhar duas enfermeiras na preparação de citotóxicos em bolsas parenterais, utilizando a tecnologia automatizada de um *robô* designado por *KIRO Oncology*. Para trabalhar com o *robô* é necessário colocar EPI, luvas e mangote esterilizados e, para além do operador deve estar presente um adjunto que auxilia na abertura do material esterilizado e na desinfeção das superfícies e materiais.

Sendo que se tratam de preparações parenterais é necessário garantir condições de assepsia, por isso antes de se iniciar o procedimento de preparação propriamente dito, são colocadas caixas de *Petri* com diferentes meios de cultura, em várias zonas do interior do *robô*, para verificar se existe ou não contaminação.

A utilização deste *robô* permite uma maior segurança comparativamente à preparação manual, principalmente quando estamos perante preparações que requerem maior cuidado durante o seu manuseamento, como é o caso dos citotóxicos. Para além disso, possibilita também a otimização da preparação da medicação no hospital e a diminuição do surgimento de erros, sendo também uma vantagem para os doentes.

Este *robô* possui leitores de códigos de barras que identificam os medicamentos a utilizar na preparação das bolsas parenterais, tornando este processo mais fácil e rápido. No entanto, torna-se também uma desvantagem quando há uma mudança no fornecedor de determinado medicamento, pois nestes casos o *robô* não consegue reconhecer o novo código de barras e o trabalho tem de ser interrompido até que seja programado o novo código.

Sendo esta operação automatizada, os operadores têm de ser muito minuciosos, pois qualquer falha ou desvio na colocação do material no interior do *robô*, pode dar origem a erros e impedir o correto funcionamento do mesmo.

### **2.3.3. Valor profissional e formação contínua**

A unidade funcional onde permaneci grande parte do tempo foi a unidade de terapia parenteral na área de Oncologia. Durante os meses em que permaneci nesta unidade, tive a oportunidade de acompanhar os farmacêuticos na validação das prescrições e da medicação antes desta ser dispensada. Sendo um trabalho de elevada responsabilidade, uma vez que se tratam de doentes oncológicos, não tive a oportunidade de realizar nenhuma validação, no entanto, participei ativamente na pesquisa de informação em livros de auxílio que são disponibilizados aos farmacêuticos, acompanhei os enfermeiros na preparação automatizada de citotóxicos, realizei um estudo estatístico sobre atrasos e reduções de doses na administração de quimioterápicos e ainda tive uma semana em que me foram disponibilizados vários artigos para ler relativamente a tratamentos oncológicos para diferentes tipos de cancro.

De forma geral, sinto que o contacto diário com os medicamentos e o acompanhamento do trabalho dos farmacêuticos nesta área ajudaram-me a expandir conhecimentos relativamente a este tema e a complementar algumas das bases que adquiri na unidade curricular de Farmácia Clínica. Por outro lado, permitiu-me perceber que me identifiquei inteiramente com o trabalho diário dos farmacêuticos em meio hospitalar, uma vez que é um trabalho desafiante e que nos permite pôr em prática os conhecimentos que adquirimos ao longo do curso.

## **2.4. AMEAÇAS (THREATS)**

### **2.4.1. Pouca preparação prática**

No decorrer do curso de MICF são poucos os conhecimentos práticos que adquirimos relativamente a farmácia hospitalar e à importância do farmacêutico neste meio,

restringindo-se apenas a uma unidade curricular. Esta percepção é notória, principalmente quando fazemos a comparação com farmácia comunitária, onde estamos muito mais aptos a aplicar os conhecimentos que adquirimos ao longo do curso assim que o finalizamos, devido à grande bagagem que este nos proporciona relativamente aos medicamentos que se vendem nas farmácias e aos serviços farmacêuticos que integram.

Um dos exemplos, é o facto de possuímos conhecimentos muito vagos da panóplia de medicamentos de uso exclusivo no hospital, como por exemplo, os medicamentos antineoplásicos, que equivocadamente achamos que são maioritariamente da responsabilidade dos médicos que os receitam, mas que na prática clínica, em meio hospitalar, são de extrema importância para que a validação da medicação seja feita corretamente, pois é muito comum surgirem erros de doses nas prescrições deste tipo de medicamentos.

## **2.5. CASOS PRÁTICOS**

### **2.5.1. Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)**

Caso de um paciente adulto com Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) em que se pretendia introduzir Acalabrutinib. A LLC é um tipo de cancro no sangue que afeta os glóbulos B (um tipo de glóbulos brancos). Geralmente a dose recomendada é de 100 mg, duas vezes por dia.

Antes do tratamento ser iniciado, foram detetadas algumas interações com medicação que o paciente já tomava que foram alertadas ao médico Hematologista:

- Acalabrutinib e Rivaroxabano (anticoagulante): O Alabrutinib aumenta os efeitos anticoagulantes de Rivaroxabano, podendo aumentar ainda mais o risco de hemorragia. O Acalabrutinib administrado isoladamente poderá por si só provocar hemorragias graves ou mesmo fatais. Perante esta interação, foi sugerido o controlo de sinais de sangramento e a avaliação do benefício-risco da toma do medicamento.
- Acalabrutinib e Alopurinol: O alopurinol é um inibidor seletivo das etapas terminais da biossíntese de ácido úrico, utilizado no tratamento da gota: Um aumenta a toxicidade do outro por sinergismo farmacodinâmico. A coadministração de ambos pode aumentar o risco de efeitos mielossupressores. Foi sugerida a redução da dose de alopurinol.

### **2.5.2. Neoplasia Colorretal estágio IV**

Caso de um paciente adulto com neoplasia colorretal estágio IV que iniciou tratamento com Fluorouracil (5FU), um medicamento pertencente à classe das fluoropirimidinas bastante utilizado em regimes de combinação na quimioterapia contra o cancro colorretal. Ao analisar a ficha clínica do doente, detetámos que o paciente era portador heterozigótico para a variante DPYD D949V, um tipo de polimorfismo de DPYD. DPYD codifica a dihidropirimidina-desidrogenase (DPD), enzima responsável pela metabolização de grande parte do 5FU, ora a deficiência da DPD está associada a toxicidade por 5FU, devido à não degradação do quimioterápico. Foi recomendada a redução de 50% da dose total.

## **PARTE II**

### **Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária na Farmácia Barreiros localizada no Porto**

Sob orientação da Dra. Cláudia Sofia Fernandes Barros



## I. INTRODUÇÃO

Este relatório foi redigido no âmbito da unidade curricular Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Coimbra.

O meu estágio em farmácia comunitária teve início na Farmácia Barreiros, localizada na Rua Serpa Pinto nº12, no Porto, na qual permaneci praticamente um mês. Posteriormente, por motivos pessoais, a continuação do estágio em farmácia comunitária ocorreu na Farmácia Barral em Lisboa.

A Farmácia Barreiros teve a sua abertura no ano 1934, pela Dra. Lapa Barreiros que se manteve no cargo de direção técnica até 1980.

Desde 2011 este estabelecimento tem evoluído de forma bastante significativa, destacando-se da maioria das outras farmácias, não só pelo espaço amplo, com um *design* modernizado, como também pela quantidade de serviços e produtos que oferece, desde medicamentos homeopáticos, produtos ortopédicos e ópticos, medicamentos manipulados de uso humano e veterinário, produtos dietéticos, artigos de cosmética e ainda artigos para recém-mães e bebés.

Para além disso, a Farmácia Barreiros encontra-se aberta 24 horas por dia, durante os 365 dias do ano, sendo uma mais-valia para os utentes, com os quais estes profissionais de saúde estabelecem uma relação de confiança e empatia.

A frequência de apenas um mês de estágio nesta farmácia permitiu-me apenas frequentar o laboratório de manipulados, que será o meu principal foco neste relatório.



## 2. ANÁLISE SWOT

### 2.1. PONTOS FORTES (STRENGTHS)

#### 2.1.1. Espaço e organização da farmácia

O *design* moderno e sofisticado da Farmácia Barreiros é notório quer do ponto de vista exterior, quer do ponto de vista interior, proporcionando desde logo um ambiente de conforto aos utentes e funcionários.

Assim que se entra na farmácia, deparamo-nos com uma ampla zona de atendimento ao público, onde os artigos se encontram extremamente bem organizados e arrumados. Os balcões são estrategicamente posicionados e separados por lineares, de modo a manter a privacidade do utente durante o atendimento. Para além disso, o atendimento funciona por ordem de senhas, sendo que pessoas grávidas ou debilitadas têm prioridade sobre os outros utentes. Este método contribui para uma maior organização da farmácia, tendo em conta que esta possui bastante movimento.

Por trás do balcão existe a zona de *backoffice* onde se encontram guardados alguns medicamentos reservados, manipulados preparados e prontos a entregar ao utente, os xaropes que não podem ser armazenados no *robô*, medicamentos de especial controlo e ainda um frigorífico para armazenamento de medicamentos de frio como alguns colírios, injetáveis e ainda alguma contraceção. É aqui que se encontra também o gabinete da Direção Técnica.

No piso -I situa-se o armazém com uma porta de acesso ao exterior, por onde ocorre a entrega e receção de encomendas, e ainda um espaço que contém computadores onde é realizada a receção de encomendas bem como a gestão de distribuição de medicamentos para outras unidades de saúde.

A zona de refeição está equipada com todos os eletrodomésticos necessários, desde um fogão, frigorífico, máquina de lavar loiça, cafeteira, e ainda um sofá e televisão que tornam o espaço mais cómodo e agradável durante os momentos de pausa.

No piso I encontra-se o *robô* de dispensa de medicamentos, que é responsável também pelo armazenamento dos mesmos nas estantes ladeadas que possuem cerca de 5 metros de altura. Esta função é possível devido à capacidade de leitura dos respetivos códigos de barras das embalagens, que permite por sua vez a sua identificação. A utilização do *robô* na farmácia permite que o farmacêutico dispense mais tempo no aconselhamento ao utente, melhorando assim o serviço de atendimento e garantindo que os utentes saiam da farmácia esclarecidos e satisfeitos. Neste piso encontra-se também uma zona onde os medicamentos são embalados de forma personalizada, principalmente para idosos, mas

também para pessoas que tomam muitos medicamentos e que optam por ter a sua medicação embalada e organizada conforme os diferentes dias do mês.

Os laboratórios estão também situados no piso I e são divididos em três salas: uma sala onde ocorre a produção de medicamentos homeopáticos, outra onde ocorre a preparação de xaropes, pomadas, cremes, géis e soluções e, por fim, uma sala onde são preparadas fórmulas à base de pós, como cápsulas e *sachês*.

Existe ainda uma sala onde os manipulados preparados são etiquetados, embalados e as fichas técnicas elaboradas. Nesta unidade são também preparadas as encomendas a serem enviadas para outras farmácias e as encomendas *online* realizadas pelos utentes.

Todo o ambiente e organização da farmácia permite que o trabalho dos funcionários seja realizado de forma organizada, rápida e eficaz, contribuindo para a satisfação não só dos trabalhadores como, consequentemente dos utentes.

### **2.1.2. Equipa de trabalho**

A Farmácia Barreiros é formada por uma vasta equipa composta por mais de 25 profissionais que contribuem para o seu bom funcionamento.

Durante a realização do meu estágio foram notórios a disponibilidade e acolhimento que todos demonstraram, quer a nível profissional, quer a nível pessoal, desde a minha integração na farmácia até o final.

O tempo que permaneci no laboratório foi uma mais-valia para a minha experiência profissional e todas as questões e dúvidas que foram surgindo, foram respondidas e esclarecidas adequadamente pelas farmacêuticas que integravam esta unidade e que se demonstraram sempre disponíveis e pacientes durante o tempo que lá estive.

Para além disso, destaco em especial a preocupação e atenção da Dra. Cláudia Barros perante os funcionários que integram a equipa da Farmácia Barreiros, que certamente são um grande contributo para o sucesso e reconhecimento que esta farmácia apresenta.

## **2.2. PONTOS FRACOS (WEAKNESSES)**

O tempo que permaneci na Farmácia Barreiros não foi suficiente para mencionar pontos fracos.

## **2.3. OPORTUNIDADES (OPPORTUNITIES)**

### **2.3.1. Experiência laboratorial**

Uma das grandes oportunidades que esta farmácia proporcionou foi sem dúvida a experiência em laboratório. Ainda são escassas as farmácias que têm o privilégio de fazer manipulação de medicamentos e, portanto, ter tido essa oportunidade foi sem dúvida uma experiência enriquecedora a nível profissional.

A rotina de laboratório iniciava-se com a verificação e apontamento da temperatura e humidade das salas e respetivos frigoríficos onde se armazenavam os manipulados de frio. Após tudo estar conforme, as fichas de preparação de manipulados para aquele dia eram agrupadas e divididas por cada uma das três salas, onde o processo de preparação propriamente dito era iniciado. No final do dia, os laboratórios e todo o material utilizado eram limpos e deixados no balcão a secar para o dia seguinte. Os reagentes eram arrumados em estantes localizadas no corredor dos laboratórios que se encontravam organizadas por ordem alfabética.

Enquanto duas farmacêuticas se encarregavam da limpeza e arrumação do laboratório, as restantes faziam a etiquetagem e embalagem dos manipulados preparados. Por fim, as encomendas a enviar para outras farmácias ou hospitais, eram separadas em diferentes sacos devidamente selados e identificados com o nome do local de destino e, posteriormente todo este processo era validado pela farmacêutica com mais anos de experiência naquele laboratório.

## **2.4. AMEAÇAS (THREATS)**

O tempo que permaneci na Farmácia Barreiros não foi suficiente para mencionar ameaças.

## **2.5. CASOS PRÁTICOS**

### **2.5.1. Preparação de uma suspensão oral de trimetoprim a 1% (m/v) com aroma de banana**

- Nome do manipulado: Suspensão oral de trimetoprim a 1% (m/v)
- Forma farmacêutica: Suspensão
- N° de lote
- Data de preparação

- Quantidade total de medicamento: 30 mL
- Prazo de validade
- N° de doses
- Advertências: Agitar antes de usar. Manter fora do alcance das crianças
- Condições de conservação: Conservar bem fechado no frigorífico
- Tipo de aplicação: Via oral
- Matérias-primas e respetiva(o) quantidade, preço e lote

<b>Matérias primas</b>	<b>N° de lote</b>	<b>Quantidade usada</b>	<b>Preço Mat. prima</b>
Essência de banana	1234	0.30 mL	0.05 €
Xarope simples	5678	29.40 g	0.45 €
Trimetoprim	91011	0.30 g	0.05 €

- Modo de preparação
  1. Pulverizar e pesar o trimetoprim. Transferir para almofariz de porcelana.
  2. Adicionar aos poucos, cerca de 1/3 da quantidade total de xarope comum e misturar.
  3. Transferir a suspensão para a proveta rolhada. Lavar o almofariz com xarope comum e juntar à restante suspensão previamente preparada. Adicionar a essência de banana. Agitar vigorosamente.
  4. Completar o volume com xarope e agitar manualmente a suspensão até que apresente aspeto homogéneo.
  5. Acondicionamento e rotulagem adequada.
- Material e equipamentos utilizados
- Tipo de embalagem interna e respetivo preço: frasco de vidro âmbar de 30 mL
- Tipo de embalagem externa e respetivo preço
- Nome do operador
- Nome do supervisor
- Assinatura do diretor técnico
- Valor PVP

**PARTE III**

**Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária na Farmácia Barral  
em Lisboa**

Sob orientação da Dra. Ana Cláudia Felisberto



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>FB</b>	Farmácia Barral
<b>IMC</b>	Índice de massa gorda
<b>MICF</b>	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
<b>MNSRM</b>	Medicamentos não sujeitos a receita medica
<b>MSRM</b>	Medicamentos sujeitos a receita médica

## I. INTRODUÇÃO

A continuação do estágio em farmácia comunitária ocorreu na Farmácia Barral (FB), localizada na Rua Augusta, 225 em Lisboa. Esta farmácia tem a particularidade de abrir todos os dias da semana até às 21h.

A FB é uma farmácia bastante antiga tendo sido fundada em 1835 e tornando-se numa das mais conceituadas farmácias do país.

No século XIX surgiu a marca Barral<sup>®</sup>, popularmente conhecida pelos seus cremes gordos, primeiramente manipulados exclusivamente nesta farmácia e posteriormente em laboratórios maiores. Entretanto esta marca foi adquirida por uma empresa italiana, mas ainda hoje em dia os seus produtos continuam a ter grande sucesso e a ser bastante solicitados em Portugal.

Relativamente ao espaço atual, a FB possui duas entradas, uma que dá acesso direto à zona de dermocosmética e outra que dá acesso à zona de dispensação de medicamentos. Atrás dos balcões de atendimento encontra-se o *backoffice*, onde se situam os medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) e onde ocorre a receção e pedido de encomendas, conferência e fecho de receituário, verificação da conformidade das justificações de dispensa, correção de validades e devolução dos produtos em final de prazo e ainda correção de *stocks*. A farmácia possui ainda um escritório onde se faz a determinação de parâmetros bioquímicos aos utentes e a medição da tensão arterial. Na cave situa-se a copa e o armazém dos produtos em excesso.

Para além do aconselhamento e dispensa de medicamentos, a FB proporciona vários outros serviços tal como determinação da pressão arterial, administração de vacinas e injetáveis, determinação de parâmetros bioquímicos como colesterol total e glicémia, disponibiliza um serviço de preparação de manipulados, faz recolha de medicamentos fora de prazo ou de embalagens vazias para o VALORMED e ainda determinação de IMC e peso corporal.

## **2. ANÁLISE SWOT**

### **2.1. PONTOS FORTES (STRENGTHS)**

#### **2.1.1. Equipa de trabalho**

Uma particularidade que se destaca na FB comparativamente à grande maioria das outras farmácias é o facto de possuir uma equipa bastante jovem e dinâmica, o que nos torna muito mais unidos, quer do ponto de vista profissional, mas também do ponto de vista pessoal.

A equipa é constituída pela Dra. Cláudia Felisberto, diretora técnica da farmácia, pela Dra. Catarina Oliveira, farmacêutica adjunta, dois técnicos de farmácia, duas técnicas auxiliares que se responsabilizam essencialmente pela área da dermocosmética e ainda por quatro farmacêuticos.

Os dias na FB são bastante agitados, uma vez que a farmácia se localiza em pleno centro de Lisboa, numa rua com grande fluxo de pessoas, em particular turistas. Ter uma boa equipa foi sem dúvida um ponto extra de motivação.

Com a ajuda dos meus colegas, que desde o início se demonstraram disponíveis e ativos na minha aprendizagem, tornei-me totalmente independente na toma de decisões e aconselhamento ao utente.

#### **2.1.2. Vasta gama de produtos**

Na FB existe uma ampla gama de produtos, principalmente na área de dermocosmética, o que leva muitos turistas a procurarem especificamente esta farmácia, por possuir marcas como a *Skin Sceuticals* que muitos dizem ser difícil de encontrar em outros estabelecimentos e mesmo em seus países. Para além disso, possui vários produtos para acne, uma solicitação bastante frequente na farmácia, principalmente devido ao uso da máscara facial, produtos para pele atópica, rosácea, hiperpigmentação, cuidados antirrugas e ainda uma vasta gama de produtos direcionados para o cabelo.

Por outro lado, os cremes gordos da marca Barral<sup>®</sup> são uma gama de referência para os consumidores que muitas vezes se dirigem a esta farmácia para comprar especificamente estes produtos. Estes eram inicialmente exclusivos da FB, mas no ano 1950 começaram a ser comercializados em outras farmácias em Lisboa. Posteriormente, no ano de 2000, esta marca foi adquirida por uma empresa italiana.

Para além dos produtos de dermocosmética, a FB possui produtos de higiene oral, nutrição, ortopedia, puericultura e veterinária.



## **2.2. PONTOS FRACOS (WEAKNESSES)**

### **2.2.1. Utentes**

A FB é uma farmácia com muitos anos e muitos clientes já estavam habituados a certos funcionários, o que por vezes torna o atendimento destes clientes muito complicado pois estes recusam-se a ser atendidos pelos mais jovens. Por outro lado, a farmácia é bastante movimentada, principalmente por turistas que não estão habituados ao sistema de senhas e não respeitam esse método, criando-se um ambiente de grande desorganização e impaciência por parte dos restantes utentes.

O facto de haver muitos turistas, implica que muitas vezes estes venham acompanhados de receitas estrangeiras que, no caso de estarem conformes, podemos aceitar apenas como justificação de dispensa. No entanto, no caso dos psicotrópicos, estes apenas poderão ser vendidos com receitas portuguesas devido ao facto de serem medicamentos bastante controlados, o que por vezes gera incompreensão por parte dos mesmos. Para aceitarmos uma receita estrangeira verificamos sempre a data de prescrição, o nome do utente, que tipo de medicação e respetiva posologia, nome do médico e respetivo número de cédula, bem como a presença de carimbo por parte do mesmo.

## **2.3. OPORTUNIDADES (OPPORTUNITIES)**

### **2.3.1. Aquisição de competências e aperfeiçoamento de conhecimentos do ponto de vista farmacêutico**

De todos os estágios efetuados, a farmácia comunitária, em particular o atendimento ao público foi sem dúvida a área onde mais evoluí profissionalmente e onde consegui aplicar grande parte dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF).

No decorrer deste estágio percebi a importância de certos detalhes que nos foram transmitidos nas aulas e que na prática podem mudar a forma como o utente nos encara profissionalmente, ou mesmo detetar erros que podem ter um impacto bastante significativo.

Para além disso, durante o meu estágio foram várias as formações que a farmácia nos ofereceu, não só a nível de cosmética como também de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) e ainda formação para a realização de testes de COVID-19 e furos de orelhas.

Semanalmente eram realizadas reuniões onde abordávamos aspetos que poderiam ser melhorados e que foram bastante úteis para corrigir alguns erros e crescer a nível profissional.

Sendo a FB bastante frequentada por turistas, este estágio foi também uma boa oportunidade para pôr em prática outras línguas.

## **2.4. AMEAÇAS (THREATS)**

### **2.4.1. Poucos funcionários**

Como já foi dito anteriormente, a FB tem grande fluxo de pessoas e a quantidade de funcionários é muito insuficiente, levando a que os utentes tenham de permanecer mais tempo na fila de espera e a que os atendimentos tenham de ser mais rápidos. Por esse motivo, desde o início do meu estágio que comecei a fazer atendimento, o que por um lado foi bom porque sinto que melhorei bastante nesse aspeto, no entanto, sinto que o trabalho de *backoffice* ficou um pouco aquém, resumindo-se apenas a receção de encomendas e verificação de receituário.

## **2.5. CASOS PRÁTICOS**

### **2.5.1. Detecção de erro numa receita eletrónica prescrita erradamente para um bebé de dois anos**

Caso de uma utente que pretendia dispensar uma receita com medicação para o tratamento de acne, mais especificamente ACNATAC<sup>®</sup> para uso tópico, cujas substâncias ativas são Clindamicina e Tretinoína e Isotretinoína em comprimidos.

Em conversa com a utente, perguntei se sabia como fazer a medicação, ao qual me respondeu que a prescrição não era para ela, mas sim para um bebé de dois anos de uma amiga. Expliquei à utente que esta prescrição não poderia ser para um bebé, uma vez que se tratava de medicação para acne e que não era indicada para um bebé de dois anos. Posteriormente liguei para o médico, ao qual me foi respondido que erradamente trocou as prescrições e que, de facto, aquela prescrição não era para a utente em questão.

Este caso demonstra a importância das questões que se colocam ao doente, quer seja durante um aconselhamento, quer seja no aviamento de uma receita médica, pois só assim poderemos garantir que estamos a dispensar a medicação correta, e a detetar eventuais erros que possam ter surgido no momento da prescrição.

### **2.5.2. Caso de cistite**

Caso de uma senhora de 32 anos que se deslocou à farmácia apresentando queixas de dor durante a micção e aumento da frequência de idas à casa de banho, indicativo de infeção urinária. Em conversa com a utente percebi que estas infeções eram recorrentes, pelo que primeiramente expliquei que não poderia proceder à venda de antibiótico sem prescrição médica e que teria que se dirigir ao hospital ou clínica para obtê-la. No entanto, sugeri a toma de Urosens forte<sup>®</sup>, um suplemento alimentar que auxilia no tratamento da infeção urinária e também na sua prevenção. Para além disso referi que poderia recorrer à utilização de produtos de higiene íntima com probióticos na sua composição, de modo a manter a estabilidade da flora vaginal e ainda a importância de beber muita água. Acrescentei a importância de evitar humidade e calor utilizando roupa íntima cómoda que favoreça a transpiração. Relativamente ao suplemento dispensado, referi que a toma era de duas cápsulas por dia, durante uma infeção, o que ajudaria a reduzir os incómodos associados à cistite e que no caso de prevenção seria apenas uma cápsula por dia.

## **PARTE IV**

### **Monografia intitulada: “Abordagem farmacológica à Leishmaniose canina”**

Sob orientação da Professora Doutora Vânia Maria Antunes Moreira Bimbo

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AnfB</b>	Anfotericina B
<b>ARG</b>	Arginase
<b>ASL</b>	Antigénio Solúvel de <i>Leishmania</i>
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>CP</b>	Cloropiridinil
<b>CPT</b>	Clorotiazolidil
<b>DHFR</b>	Dihidrofolato Redutase
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DTH</b>	Teste de Hipersensibilidade do Tipo Retardado
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
<b>ESP</b>	Proteínas secretadas-excretadas
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GB</b>	Glóbulos brancos
<b>HJ</b>	Hormona Juvenil
<b>ICC</b>	Imunocomplexos Circulantes
<b>IE</b>	Índice de Estimulação
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferão Gama
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutânea
<b>LCan</b>	Leishmaniose Canina
<b>LiARG</b>	Arginase da <i>Leishmania infantum</i>
<b>LMC</b>	Leishmaniose mucocutânea
<b>Lmp27<sup>-/-</sup></b>	<i>Leishmania major</i> sem o gene p27
<b>LTopIB</b>	Topoisomerase IB de <i>Leishmania</i>
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>MTT</b>	Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
<b>NOAEL</b>	Nível Sem Efeitos Adversos Observados
<b>NOS</b>	Óxido Nítrico Sintase
<b>ODC</b>	Ornitina Descarboxilase
<b>OMD</b>	Organização Mundial de Saúde

<b>Pgp</b>	Glicoproteína-P específica
<b>RCI</b>	Regulador do Crescimento dos Insetos
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>SbIII</b>	Antimónio Trivalente
<b>SbV</b>	Antimónio Pentavalente
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>Th1</b>	Linfócitos T helper 1
<b>Th2</b>	Linfócitos T helper 2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>TopIB</b>	Topoisomerase IB
<b>TR</b>	Tripanotiona redutase
<b>Wt</b>	<i>Wild type</i>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Taxonomia de <i>Leishmania</i> .....	41
<b>Figura 2:</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	42
<b>Figura 3:</b> Estrutura molecular: Deltametrina, Flumetrina e Permetrina.....	46
<b>Figura 4:</b> Estruturas moleculares: Imidacloprida e Dinotefurano.....	47
<b>Figura 5:</b> Estrutura molecular do Piriproxifeno.....	48
<b>Figura 6:</b> Estrutura molecular do Finopril.....	48
<b>Figura 7:</b> Resultados obtidos na contagem de: macrófagos infectados, amastigotas/100 macrófagos e amastigotas/macrófagos.....	52
<b>Figura 8:</b> Resultados obtidos na medição do diâmetro das lesões (A) nas semanas 1, 4, 8 e 12 após inoculação e na determinação da carga parasitária no fígado (B) e no baço (C) de ratos BALB/c 4 e 12 semanas após inoculação.....	53
<b>Figura 9:</b> Resultados da medição das concentrações das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 produzidas pelos glóbulos brancos do baço, utilizando o método ELISA sanduíche, após 4 e 12 semanas.....	54
<b>Figura 10:</b> Resultados obtidos na determinação da proliferação linfocitária utilizando o Teste MTT, 4 e 12 semanas após inoculação.....	55
<b>Figura 11:</b> Resultados obtidos da determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a, pelo método ELISA, 4 e 12 semanas após inoculação dos ratos BALB/c com Lmp27 <sup>-/-</sup> e Wt.....	56
<b>Figura 12:</b> Relação da resposta Th1/Th2 do grupo Lmp27 <sup>-/-</sup> e do grupo Wt, tendo em consideração os resultados obtidos anteriormente na determinação dos anticorpos e das citocinas.....	56
<b>Figura 13:</b> Resultados obtidos no teste de hipersensibilidade do tipo retardado (DTH)....	57
<b>Figura 14:</b> Métodos de diagnóstico da LCan.....	61
<b>Figura 15:</b> Abordagem clínica de diagnóstico de LCan.....	61
<b>Figura 16:</b> Estrutura molecular do Alopurinol.....	63
<b>Figura 17:</b> Estruturas moleculares: Antimoniato de meglumina e Estibogluconato de sódio.....	64
<b>Figura 18:</b> Estrutura molecular da Miltefosina.....	65
<b>Figura 19:</b> Estrutura molecular da Anfotericina B.....	66
<b>Figura 20:</b> Estrutura molecular da Aminosidina.....	66
<b>Figura 21:</b> Estrutura molecular da Marbofloxacina.....	67
<b>Figura 22:</b> Estrutura molecular da Domperidona.....	68
<b>Figura 23:</b> Estrutura química dos venenos das TopIB.....	70

<b>Figura 24:</b> Bioatividade de aromaticinas em promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> – iRFP e em glóbulos brancos do baço de amastigotas infetado.....	72
<b>Figura 25:</b> Inibição de LiARG por derivados de chalconas.....	73
<b>Figura 26:</b> Estrutura dos derivados de chalconas que demonstraram inibição de LiARG superior a 50%.....	74
<b>Figura 27:</b> Ligação dos derivados de chalconas obtidas através de encaixe molecular.....	75
<b>Figura 28:</b> Resultados in silico da farmacocinética e propriedades toxicológicas dos derivados de chalconas mais ativos contra LiARG (LC32, LC39 e LC41) e miltefosina.....	77
<b>Figura 29:</b> Inibição de LiARG, atividade anti- <i>L. infantum</i> e citotoxicidade dos derivados de chalconas.....	77
<b>Figura 30:</b> Efeito dos derivados de chalcona na produção de NO pelos macrófagos infetados com <i>L. infantum</i> .....	79
<b>Tabela 1:</b> Substâncias utilizadas em inseticidas e repelentes.....	46
<b>Tabela 2:</b> Manifestações clínicas e alterações laboratoriais encontradas na LCan devido a <i>L. infantum</i> .....	59



## **ABSTRACT**

Canine leishmaniasis (CanL) is a serious disease transmitted by the commonly known “sand fly”. This disease affects both humans and some animals, including dogs and cats.

Infected animals show a wide variety of signs and symptoms, so sometimes it’s difficult to diagnose based only on physical examinations.

There are several methods to prevent this disease, including collars, spot-on, sprays and vaccination, the latter being the most effective. However, the combination of several preventive methods contributes to better protection of the animals and consequently of humans, since domestic animals are the main reservoir of human contamination.

Currently, marketed vaccines to prevent CanL are second generation vaccines, however, other types of vaccination have been studied as prophylactic strategies.

The current CanL treatment used acts only in the alleviation of symptoms and disease progression, not being able to eliminate the parasite completely. On the other hand, the drugs used have several limitations. They are highly toxic, administration is prolonged, there is a high cost and there are difficulties in administration. Moreover, the drugs are not able to surpass the parasite’s resistance barriers sometimes.

The knowledge of parasite targets and resistance mechanisms are two fundamental factors for the development of new treatments capable of overcoming the currently marketed drugs limitations.

This thesis focuses on the review of several experimental compounds and some drugs, to understand what kind of strategies are being used, what are the most appropriate molecular structures, and the which limitations still need to be overcome for development of more effective and less toxic molecules.

**Keywords:** canine leishmaniasis; treatment; new molecules; dogs; *Leishmania infantum*.

## RESUMO

A Leishmaniose canina (LCan) é uma doença grave, transmitida através de um mosquito vulgarmente conhecido como “mosquito palha”. Esta doença afeta tanto o ser humano, como alguns animais, entre eles o cão e o gato.

Os animais infetados apresentam uma grande variedade de sinais e sintomas, pelo que por vezes é difícil o seu diagnóstico tendo por base apenas exames físicos.

Existem vários métodos para prevenir esta doença, recorrendo a coleiras, *spot-on*, *sprays* e principalmente à vacinação, sendo esta última a mais eficaz, no entanto, a combinação de vários métodos de prevenção contribui para uma melhor proteção dos animais e, conseqüentemente do ser humano, uma vez que os animais domésticos são considerados os principais reservatórios de contaminação do Homem.

Atualmente as vacinas comercializadas para a prevenção de LCan são vacinas de segunda geração, no entanto, outros tipos de vacinas têm sido estudados no sentido de amplificação das estratégias profiláticas.

O tratamento de LCan atualmente utilizado atua apenas na amenização dos sintomas e de progressão da doença, não sendo capaz de eliminar o parasita por completo. Por outro lado, os compostos utilizados apresentam diversas limitações tais como elevada toxicidade, necessidade de administração prolongada, elevado custo, dificuldade na administração e por vezes não são capazes de ultrapassar as barreiras de resistência do parasita.

O conhecimento dos alvos e mecanismos de resistência dos parasitas são dois fatores fundamentais para o desenvolvimento de novos tratamentos capazes de contornar as limitações dos medicamentos atualmente comercializados.

Esta monografia concentra-se essencialmente na revisão de vários compostos experimentais e fármacos já comercializados ou não, para que possamos entender que tipo de estratégias estão a ser utilizadas, quais as estruturas moleculares mais adequadas e que limitações terão que ser ainda ultrapassadas para o desenvolvimento de moléculas mais eficazes e menos tóxicas.

**Palavras-chave:** leishmaniose canina; tratamento; novas moléculas; cães; *Leishmania infantum*.

# I. INTRODUÇÃO

A leishmaniose canina (CanL) é uma doença crónica grave, causada por um parasita do género *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae* e que afeta milhões de cães, podendo mesmo levar à morte.<sup>1</sup> Relativamente à sua classificação taxonómica, a *Leishmania* pode ser dividida em diferentes sub-géneros e espécies (Fig.1).<sup>2</sup>

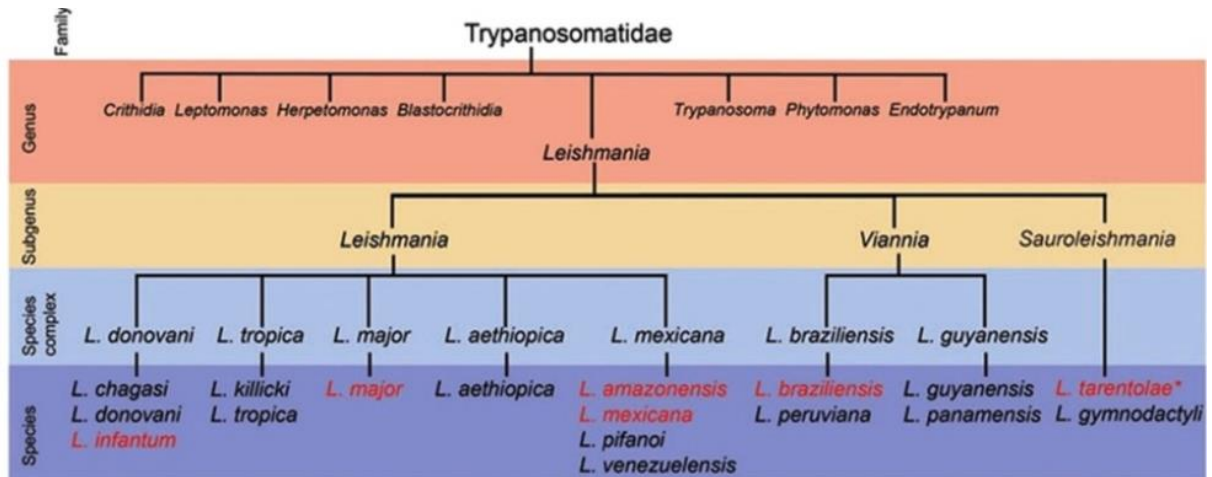


Figura 1: Taxonomia de *Leishmania*; Classificação em género, sub-género e espécies (adaptado de <sup>2</sup>)

Existe uma enorme variedade de espécies de *Leishmania*, sendo a maioria zoonótica, no entanto, a que mais afeta a população canina é a *Leishmania infantum*.<sup>3</sup> Esta espécie foi descrita pela primeira vez no ano 1908, por Nicolle e Comte na Tunísia. É endémica em cerca de 88 países, sendo também uma preocupação em regiões não-endémicas.<sup>3</sup>

Investigadores acreditam que a *Leishmania infantum* tenha sido importada para a América por cães de colónias europeias, durante a colonização da América do Sul, onde foram também encontrados cães infetados com outras espécies que são normalmente encontradas em humanos, no entanto, foi verificado que estes não são o principal reservatório dessas espécies.<sup>3</sup>

A LCan é muitas vezes associada às condições socioeconómicas dos donos e, na verdade, um estudo realizado no Brasil, demonstrou que indivíduos com baixas condições socioeconómicas têm menos acesso à informação e conhecimento relativamente a esta doença, e por isso não atuam tanto na sua prevenção. Isto vem por sua vez reforçar a necessidade de educar a população relativamente a este assunto e a necessidade de uma vigilância contínua a nível da saúde, priorizando os indivíduos com condições socioeconómicas mais limitadas.<sup>4</sup>

Ao longo do tempo, os cientistas foram tentando compreender melhor esta infeção e os diversos tipos de manifestações clínicas que os animais apresentam no sentido de

desenvolverem técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas, e também de descoberta de novas moléculas que possam ser eficazes no tratamento desta infecção.<sup>3</sup>

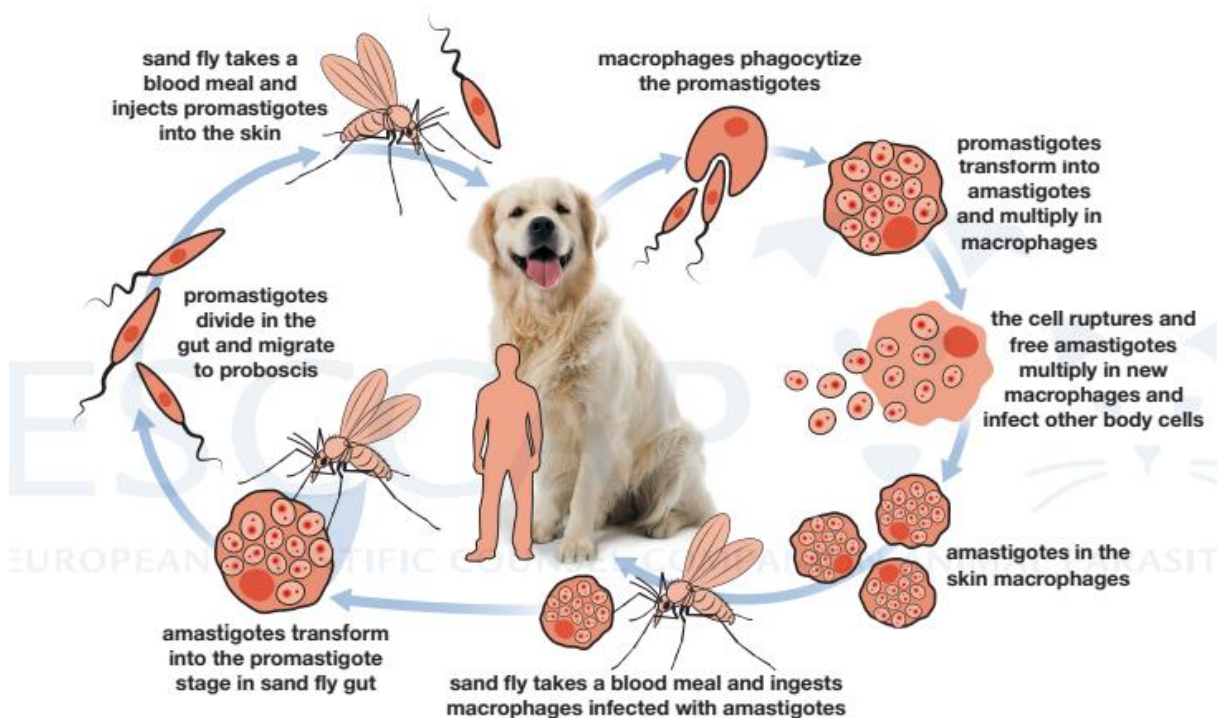
Esta dissertação tem como principal objetivo a apresentação de fármacos atualmente utilizados na LCan, bem como algumas moléculas estudadas recentemente (2019 e 2021) no tratamento desta doença que afeta não só cães e gatos, como também o ser humano. A seleção destas moléculas tem por base a análise das suas estruturas moleculares e de que forma é que essas estruturas moleculares, bem como os seus respetivos mecanismos de ação poderão ser eficazes contra *Leishmania*, apresentando assim algumas estratégias que poderão ser relevantes para o desenvolvimento de novos fármacos, que sejam mais efetivos contra a doença, que sejam capazes de contornar os mecanismos de resistência do parasita e que, por outro lado, possuam menos efeitos secundários para o hospedeiro.

## 2. TRANSMISSÃO

A leishmaniose no caso dos humanos é dividida em três categorias, de acordo com o parasita causador da doença e dos sintomas que se manifestam: leishmaniose cutânea (LC), quando os sintomas são sobretudo manifestados na pele; muco-cutânea (LMC) quando afeta tanto a pele como as mucosas e leishmaniose visceral (LV) quando os órgãos são os principais afetados. No caso dos cães ela é classificada como visceral uma vez que é causada pelo parasita que provoca a LV em humanos, no entanto, o mais comum é estes animais apresentarem uma combinação de sintomas cutâneos, mucocutâneos e viscerais.<sup>3</sup>

Os principais transmissores desta doença são os flebótomos (*Phlebotominae*), popularmente conhecidos como “mosquitos-palha”. Dentro desta sub-família temos o género *Lutzomyia*, o principal vetor do Novo Mundo (América) e o género *Phlebotomus* que é responsável pela transmissão da doença no Velho Mundo (África, Europa e Ásia).<sup>4</sup>

### 2.1. CICLO DE VIDA DO PARASITA



**Figura 2:** Ciclo de vida de *Leishmania* (adaptado de *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites*)

O ciclo de vida do parasita (Fig.2) ocorre entre o hospedeiro vertebrado e o mosquito vetor. As fêmeas são as responsáveis pela transmissão do parasita pois são as únicas que se alimentam de sangue.<sup>4</sup>

O ciclo de vida da *Leishmania*, quando fora do hospedeiro vertebrado, ocorre sobretudo no trato digestivo do inseto vetor e inicia-se quando o mosquito ingere sangue, onde os macrófagos estão contaminados com as formas amastigotas do parasita.<sup>5</sup>

No intestino, os amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicos que são capazes de se multiplicar. Mais tarde, os parasitas transformam-se em promastigotas metacíclicos, que correspondem à forma infecciosa do hospedeiro vertebrado, e estes migram para a válvula faríngea, onde são posteriormente transmitidos durante a próxima alimentação de sangue do vetor.<sup>5</sup>

No hospedeiro vertebrado, os promastigotas metacíclicos são posteriormente fagocitados pelos macrófagos, acumulando-se no interior dos fagolisossomas. Aqui diferenciam-se em amastigotas, destroem os macrófagos e são libertados danificando células envolventes, até chegarem aos órgãos do hospedeiro através do sistema vascular do mesmo (progressão da infecção). É aqui que o ciclo é reiniciado, pois os mosquitos ao picarem novamente o hospedeiro, vão ingerir as formas amastigotas.<sup>5</sup>

### **3. PREVENÇÃO**

Hoje em dia é possível atuar na prevenção da doença recorrendo à vacinação, à utilização de inseticidas e repelentes e à aplicação de práticas que minimizam o risco de picada dos animais por flebótomos.<sup>7</sup>

O mosquito-palha é maioritariamente encontrado em locais húmidos, escuros, quentes e com muita vegetação e por isso é também importante que nos períodos em que este está mais ativo, os cuidadores tenham especial cuidado em minimizar estas condições e o contacto dos seus animais com os insetos. Desta forma, manter os cães recolhidos em casa no final da tarde e durante o amanhecer, reduzir a intensidade da luz em casa durante a noite e recorrer à utilização de redes mosquiteiras, são práticas que ajudam a minimizar as chances de picada.<sup>7</sup>

#### **3.1. Inseticidas e repelentes**

Complementarmente à vacinação podem e devem ser utilizados outros métodos preventivos tais como: coleiras, *spot-on* (pipetas para unção puntiforme) e *sprays* de modo a

otimizá-la. Isto porque os repelentes reduzem o risco de infecção, mas não previnem o aparecimento de uma doença ativa, caso o cão seja infetado. Já a vacinação minimiza o risco de progressão da doença e a probabilidade de os cães infetados desenvolverem sinais clínicos mais graves, no entanto, não previne a infecção.<sup>6</sup>

Algumas das substâncias que compõem esses dispositivos profiláticos, encontram-se na tabela seguinte (Tab. 1)

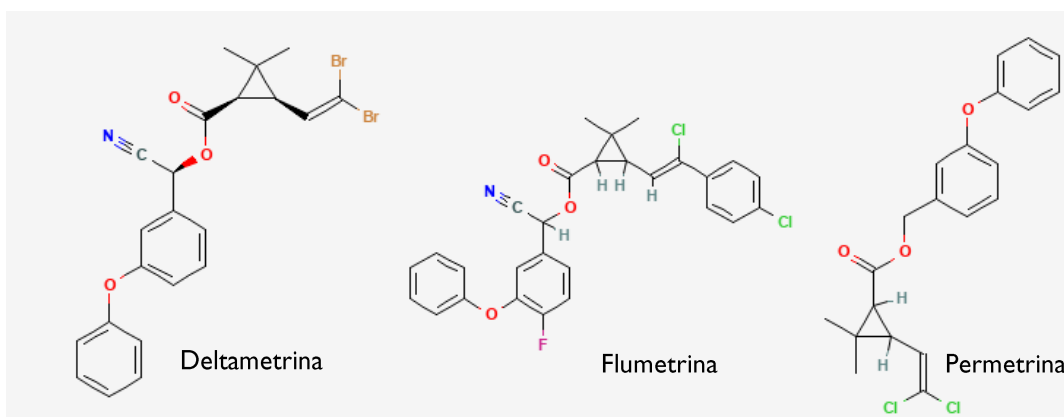
**Tabela 1:** Substâncias utilizadas em inseticidas e repelentes (adaptado de <sup>7</sup>)

Fármaco	Modo de aplicação	Duração
Deltametrina a 4%	Coleira	4-6 meses
4.5% Flumetrina + 10% Imidacloprida	Coleira	8 meses
Permetrina a 65%	“Spot-on”	2 semanas
50% permetrina + 10% imidacloprida	“Spot-on”	3-4 semanas
36.08% permetrina + 4.95 dinotefurano + 0.44% piriproxifeno	“Spot-on”	4 semanas
61% permetrina + 54.5% fipronil	“Spot-on”	4 semanas

### 3.1.1. Piretróides

Piretróides são compostos químicos sintéticos comumente encontrados em inseticidas e repelentes para insetos. Dentro desta classe encontram-se as substâncias: deltametrina, flumetrina e a permetrina, cujo modo de ação é análogo.<sup>8</sup>

O mecanismo de ação baseia-se na interferência com os canais de sódio das membranas celulares nervosas do parasita, que levam ao aumento da permeabilidade ao sódio, o que resulta numa perturbação da neurotransmissão e, conseqüentemente na morte do parasita.<sup>8</sup>



**Figura 3:** Estruturas moleculares: Deltametrina, Flumetrina e Permetrina (PubChem)

### 3.1.2. Neonicotinóides

As substâncias pertencentes a este grupo atuam como agonistas dos recetores nicotínicos, na membrana das células pós-sinápticas do Sistema Nervoso Central (SNC) dos insetos. Este mecanismo leva a uma hiperatividade nervosa, causada por impulsos excitatórios repetidos e, conseqüentemente à morte do inseto.<sup>8</sup>

A imidacloprida é um ectoparasiticida pertencente à classe dos neonicotinóides de primeira geração, enquanto o dinotefurano é um nicotinóide de segunda geração.<sup>8</sup> A diferença entre os compostos de primeira geração e os de segunda geração está no facto de os primeiros possuírem um grupo cloropiridinil heterocíclico, enquanto os segundos possuem um grupo clorotiazolidil heterocíclico ou ainda um grupo tetra-hidrofuranometil, como é o caso do dinotefurano.<sup>29</sup>

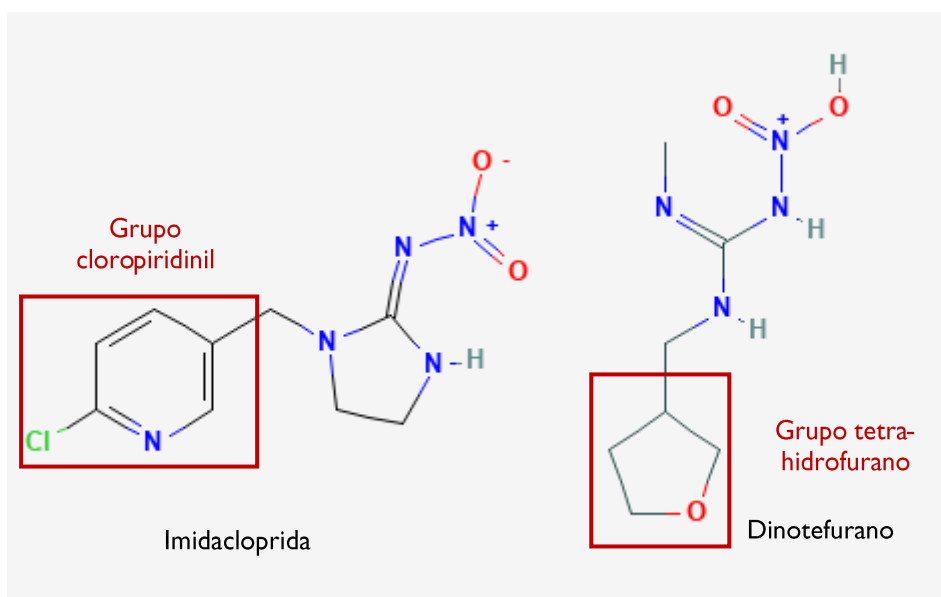


Figura 4: Estruturas moleculares: Imidacloprida e Dinotefurano (PubChem)

### 3.1.3. Hormonas juvenis análogas

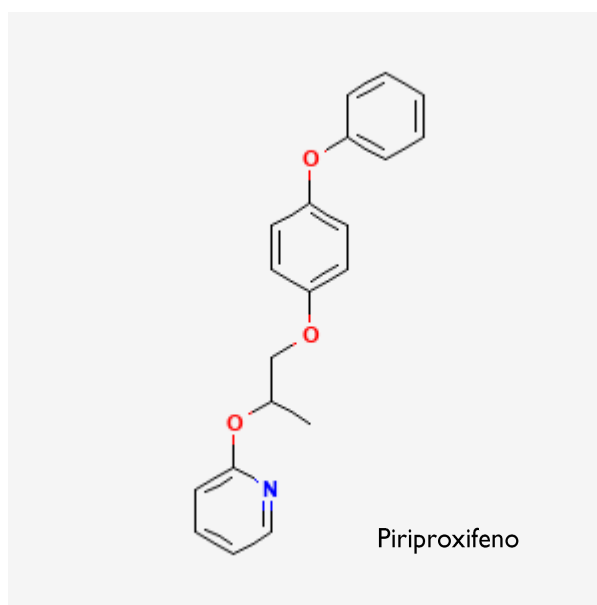
O piriproxifeno é um Regulador do Crescimento dos Insetos (RCI) pertencente à classe das hormonas juvenis análogas. É considerado um regulador do crescimento de insetos de amplo espectro e pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros inseticidas como o fipronil, a imidacloprida, dinotefurano ou piretróides.<sup>9</sup>

A sua toxicidade oral em mamíferos é muito baixa, apresentando um Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis (NOAEL) para cães, de cerca de 100 mg/kg/dia, o que se torna apelativa a sua utilização.<sup>9</sup>

O piriproxifeno atua mimetizando uma Hormona Juvenil (HJ). Quando os níveis naturais de HJ “caem” durante a maturação dos insetos, esta substância substitui essas



hormonas e, conseqüentemente o desenvolvimento dos ovos (efeito ovicida), larvas e pupas (efeito larvicida) é interrompido e estes acabam por morrer.<sup>9</sup>



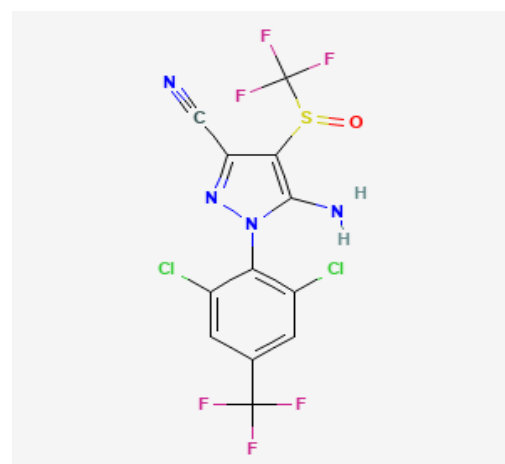
**Figura 5:** Estrutura molecular do Piriproxifeno (*PubChem*)

### 3.1.4. Fenilpirazóis

O fipronil é um inseticida de amplo espectro que atua como antagonista do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibidor do sistema nervoso central (SNC). A inibição destes recetores leva a uma excitação excessiva do SNC e o parasita acaba por morrer. Estudos demonstraram que o metabolito de oxidação do fipronil, fipronil sulfona, é também capaz de bloquear a passagem dos iões de cloro através dos recetores GABA e dos canais de glutamato-cloro.<sup>10</sup>

## 3.2. Prevenção Imunoprolática

A vacinação é provavelmente o método mais eficaz para o controlo da LCan. Vários tipos de vacinas têm sido estudados para a profilaxia desta doença, no entanto, ainda existem muitas limitações, tais como a dificuldade em encontrar modelos animais que reproduzam naturalmente esta doença e respostas imunes requeridas para a eficácia da mesma. Por outro lado, estudos anteriores revelaram a insegurança de



**Figura 6:** Estrutura molecular do Fipronil (*PubChem*)

extrapolar resultados de modelos animais experimentais, como roedores, para doenças humanas ou em cães.

Atualmente já foram estudados três tipos de vacinas: vacinas com parasitas vivos/mortos (vacinas de primeira geração), vacinas com antígenos purificados de *Leishmania* ou bactérias recombinantes que expressam antígenos de *Leishmania* (vacinas de segunda geração) e ainda as vacinas de DNA (vacinas de terceira geração).<sup>11</sup>

A progressão da infecção depende da eficácia da resposta imune do hospedeiro e da virulência do parasita, no entanto, cães clinicamente resistentes, ou seja, com capacidade de controlarem a infecção não estão completamente livres de se tornarem suscetíveis, uma vez que condições de imunossupressão ou a presença de doenças concomitantes poderão levar à progressão da doença.<sup>11</sup>

Quando há uma exposição ao parasita, as células T medeiam a resposta imune protetora, em particular as células CD4+ T helper 1 (Th1). Estas secretam citocinas tais como: interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) que induzem a atividade dos macrófagos contra *Leishmania*. Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os macrófagos desempenham um papel fundamental no controlo desta infecção, pois são responsáveis pela produção de óxido nítrico (NO), a principal molécula efetora, capaz de realizar apoptose de amastigotas.<sup>11</sup>

*L. infantum* induz respostas mistas Th1 e Th2, sendo que o controlo da replicação do parasita e progressão da doença são determinados pelo equilíbrio entre ambas.<sup>11</sup>

Num estudo realizado com murganhos, foi demonstrado que os linfócitos Th1 estão associados à proteção e os Th2 estão associados ao desenvolvimento da doença, assim sendo, a resistência à LCan está associada a uma predominância de citocinas Th1 e a progressão da doença está essencialmente relacionada com uma predominância de citocinas Th2.<sup>12</sup>

Alguns estudos correlacionaram o envolvimento de CD8+ na resistência à LCan, uma vez que estes linfócitos foram detetados em cães assintomáticos infetados experimentalmente com o parasita, mas não foram detetados em animais sintomáticos. Por outro lado, foi observada também uma diminuição de células CD4+ e CD8+, em cães infetados naturalmente, tendo ocorrido o estabelecimento destas aquando do tratamento. Isto leva-nos a pensar que a lise direta de macrófagos infetados por linfócitos T citotóxicos, representa um mecanismo adicional na resistência à doença.<sup>11</sup>

### 3.2.1. Vacinas comercializadas em Portugal

Em Portugal existem duas vacinas aprovadas para a Leishmaniose canina, ambas de segunda geração: a CaniLeish® e a Letifend®, no entanto, estas vacinas não são preventivas da infeção, mas sim da progressão da doença, tendo uma eficácia de cerca de 70%<sup>11</sup>.

#### 3.2.1.1. CaniLeish® (LIESP/QA-21)

A CaniLeish® é constituída por uma suspensão de proteínas secretadas-excretadas (ESP) de *Leishmania infantum* e pelo adjuvante QA-21. Estas proteínas são libertadas durante o crescimento do parasita, portanto, ao serem administradas em cães numa fase tão precoce, o seu sistema imunitário irá começar a produzir anticorpos contra elas. Assim que o animal seja exposto ao parasita, o seu sistema imunitário responderá de forma muito mais rápida e adequada, contribuindo para a proteção contra uma infeção ativa e sintomática.<sup>13</sup>

Esta vacina é geralmente administrada em cães com pelo menos seis meses de idade e não deve ser administrada em cães que já sejam seropositivos para esta doença, daí que normalmente sejam realizados testes de diagnóstico rápidos antes da vacinação. Embora tenham sido realizados estudos que provaram a segurança desta vacina tanto em cães negativos como em cães positivos para a leishmaniose, foi demonstrado que não existe qualquer benefício na manutenção do programa de vacinação em cães que foram vacinados, mas que ainda assim evoluíram para uma infeção ativa.<sup>13</sup>

A administração desta vacina é dividida em três injeções com intervalos de três semanas entre cada. Posteriormente é feito um reforço anual com apenas uma dose, para manutenção do efeito da vacina.<sup>13</sup>

Estudos realizados em zonas endémicas, provaram que houve uma diminuição no número de cães com infeção ativa ou doença sintomática, após administração de CaniLeish®.<sup>13</sup>

Algumas das reações adversas que podem surgir após a sua administração são: tumefação, dor à palpação, eritema, nódulos, hipertermia, apatia, e perturbações digestivas, que desaparecem espontaneamente após alguns dias ou semanas.<sup>13</sup> Comparativamente à Letifend® esta vacina tem demonstrado maior número de reações adversas, sendo que muitos hospitais veterinários já deixaram de a utilizar.

### **3.2.1.2. Letifend®**

A Letifend® é atualmente a vacina mais utilizada em Portugal. É constituída por proteína Q recombinante composta por cinco antígenos diferentes de *Leishmania infantum* e, ao contrário da Canileish®, esta vacina não contém adjuvante.<sup>6,14</sup>

Estudos realizados laboratorialmente demonstraram uma redução significativa dos sinais clínicos e da carga parasitária no baço e gânglios linfáticos, comprovando a eficácia desta vacina na progressão da doença.<sup>14</sup>

Um dos seus efeitos adversos mais comuns é prurido no local da injeção, que normalmente desaparece num período de até 4 horas.<sup>14</sup>

A administração inicial desta vacina é feita através da injeção de uma única dose a ser administrada em cães a partir dos seis meses de idade, de modo a reduzir o risco de uma infeção ativa. Anualmente é feito um reforço com a mesma dose para garantir a manutenção do efeito da vacina<sup>14</sup>

A progressão da doença de LCan está geralmente associada a um aumento da imunossupressão dos cães causada pela presença de citocinas imunorreguladoras e por um aumento de anticorpos específicos para o parasita, sendo que a presença de manifestações clínicas está diretamente relacionada com a resposta imune do hospedeiro e ainda com a deposição de imunocomplexos circulantes (ICC) em diferentes tecidos, principalmente nos rins, causando lesões renais.<sup>15</sup>

Após demonstração da correlação entre os níveis de ICC e o estadió da doença em cães infetados, foi realizado um estudo que demonstrou que esta vacina era capaz de diminuir os níveis de ICC e da carga parasitária e, conseqüentemente, causar uma menor severidade da doença e de lesões. Para além disso, a vacina revelou também auxiliar no aumento de serpinas, uma estratégia defensora do hospedeiro contra doenças parasitárias, e ainda no aumento das proteínas do sistema complemento.<sup>15</sup>

### **3.2.1.3. Knockout do gene p27 de *Leishmania major* como candidata a vacina viva atenuada**

Como foi referido anteriormente, as vacinas atualmente comercializadas em Portugal são vacinas de segunda geração. A apresentação deste composto que se encontra ainda em fase de estudo, tem como principal objetivo exemplificar outros tipos de mecanismos de ação que poderão ser a chave para o desenvolvimento de novas vacinas, mais eficazes, mais seletivas para o parasita e menos tóxicas para o hospedeiro.

As vacinas vivas atenuadas são constituídas pelo agente patogénico vivo, mas de forma atenuada com o objetivo de este desencadear uma resposta imunitária, sem risco de provocar doença. Assim, quando o animal é infetado com este parasita, o seu sistema imunológico já estará preparado para combater a infeção, uma vez que já foi desencadeada uma resposta imunitária contra o agente atenuado presente na vacina.<sup>16</sup>

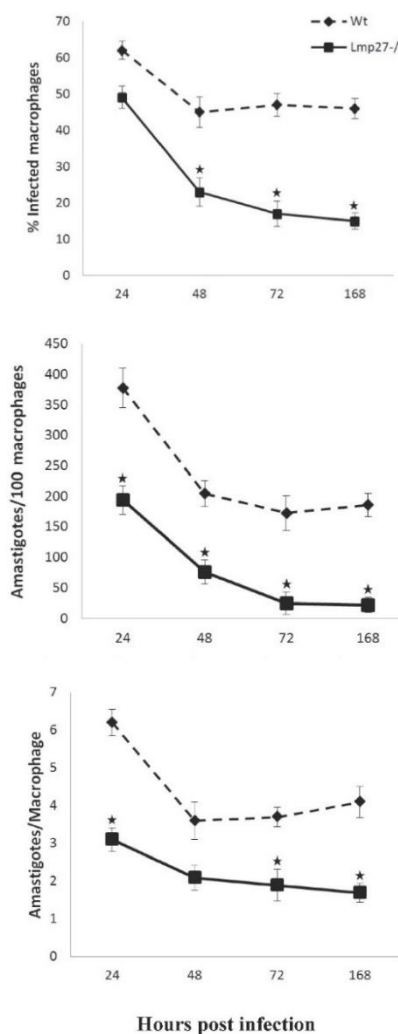
A modificação genética de *Leishmania major* (*L. major*), por eliminação de genes virulentos essenciais ao parasita tem sido avaliada como uma estratégia para o desenvolvimento de novas vacinas contra LCan. A proteína p27 é um componente do complexo citocromo oxidase (COX) presente na membrana mitocondrial interna do parasita, sendo responsável pela síntese de ATP.<sup>16</sup>

Um estudo no Irão foi realizado com o intuito de avaliar a capacidade de um mutante vivo atenuado de *L. major* sem o gene p27 (*Lmp27<sup>-/-</sup>*) como uma possível estratégia para o desenvolvimento de novas vacinas contra a leishmaniose cutânea canina.<sup>16</sup>

Para avaliar a infeção de macrófagos, foram utilizados macrófagos peritoneais de ratos BALB/c infetados com parasitas *Lmp27<sup>-/-</sup>* e parasitas *L. major* Wt (Wild Type), corados com Giemsa, tendo estes sido avaliados durante diferentes momentos (Fig.7)<sup>16</sup>

Após 72h, verifica-se (Fig.7) que a percentagem de macrófagos infetados, assim como a quantidade de amastigotas é bem menor nas infeções causadas por parasitas *Lmp27<sup>-/-</sup>* comparativamente às infeções causadas por parasitas Wt. Em 168h a percentagem de macrófagos infetados com *Lmp27<sup>-/-</sup>* diminuiu significativamente chegando a 15%. Por outro lado, a sua taxa de infeção também demonstrou tendencialmente uma diminuição, ao contrário das infeções com Wt.<sup>16</sup>

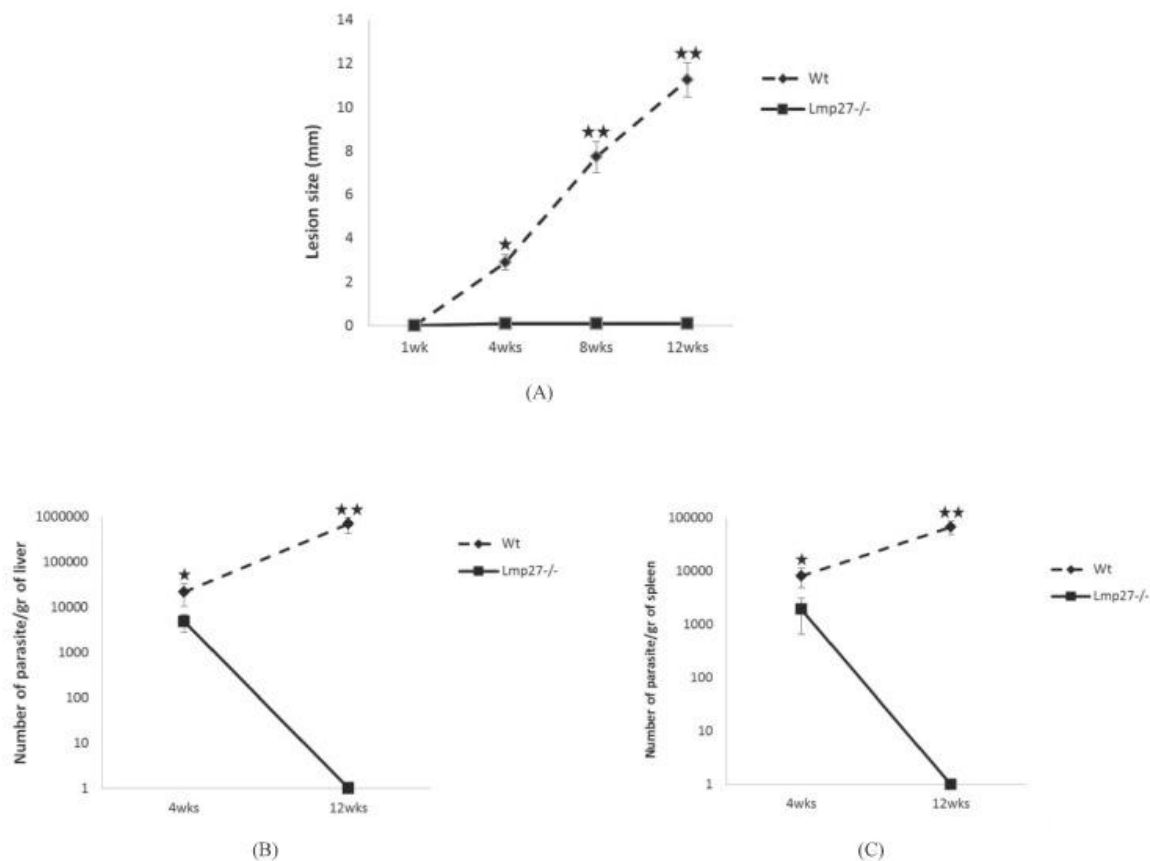
Com estes resultados, verifica-se que a remoção de genes essenciais para a sobrevivência, crescimento e virulência do parasita vão diminuir a sua capacidade de infeção no hospedeiro e ainda aumentar a suscetibilidade do parasita aos fármacos, que é o que se pretende, uma



**Figura 7:** Resultados obtidos na contagem de: macrófagos infetados, amastigotas/100 macrófagos e amastigotas/macrófagos (\*p<0.01). (adaptado de <sup>16</sup>)

vez que estes tipos de vacinas devem ser atenuadas o suficiente para que não causem infecção no hospedeiro, mas induzam uma resposta imunitária capaz de eliminar o parasita.

Na avaliação do perfil de segurança (Fig.8), a presença e/ou desenvolvimento de lesões no local de inoculação de *Lmp27<sup>-/-</sup>* e Wt foram regularmente verificadas. Para efeitos de análise de possíveis efeitos colaterais, nas semanas 4 e 12 após inoculação, a carga parasitária no fígado e no baço também foram avaliadas.<sup>16</sup>



**Figura 8:** Resultados obtidos na medição do diâmetro das lesões (A) nas semanas 1, 4, 8 e 12 após inoculação e na determinação da carga parasitária no fígado (B) e no baço (C) de ratos BALB/c 4 e 12 semanas após inoculação. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  (adaptado de <sup>16</sup>)

Os resultados obtidos (Fig.8) demonstraram que os animais do grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>* não apresentaram desenvolvimento significativo de lesões no local de inoculação, e a sua carga parasitária, tanto no fígado como no baço, foi significativamente menor comparativamente ao grupo Wt. Por outro lado, no grupo Wt ocorreram formações de lesões, cujo tamanho aumentou no decurso das 12 semanas.<sup>16</sup>

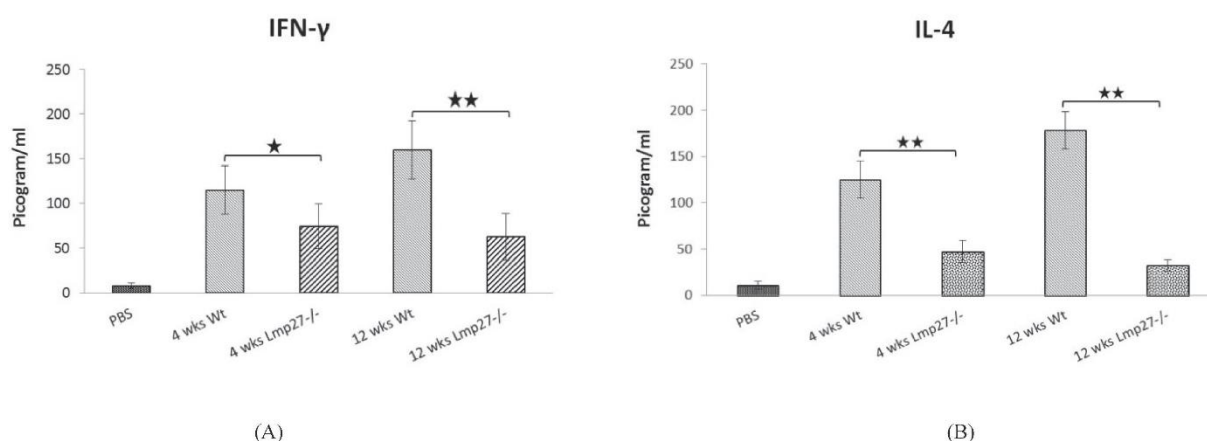
Todos os fármacos antes de serem comercializados foram testados a nível de segurança, pois por muito eficaz que uma substância seja contra uma determinada doença, se provoca danos no organismo de quem o toma, não faz sentido ser comercializada. Neste

caso, os resultados de segurança foram satisfatórios, uma vez que a inoculação com *Lmp27<sup>-/-</sup>* demonstrou ser segura em ratos BALB/c.<sup>16</sup>

Neste estudo foi também avaliada a evolução da resposta imunológica nos ratos após inoculação com *Lmp27<sup>-/-</sup>* e Wt. Como já foi dito anteriormente, a evolução de uma resposta do tipo Th1 está associada a proteção, enquanto a evolução de uma resposta tipo Th2 está associada à progressão da infeção.<sup>16</sup>

Os principais subtipos de citocinas e anticorpos indicativos de uma resposta Th1 são IFN- $\gamma$  e IgG2a, enquanto em Th2 são principalmente os subtipos IL-4 e IgG1. Através do conhecimento desta afirmação foi possível avaliar os tipos de resposta de cada um dos grupos.<sup>16</sup>

Relativamente à produção de citocinas pelos glóbulos brancos (GB) do baço, foram medidas as concentrações de IFN- $\gamma$  e IL-4 utilizando o método ELISA sanduíche (Fig.9).<sup>16</sup>

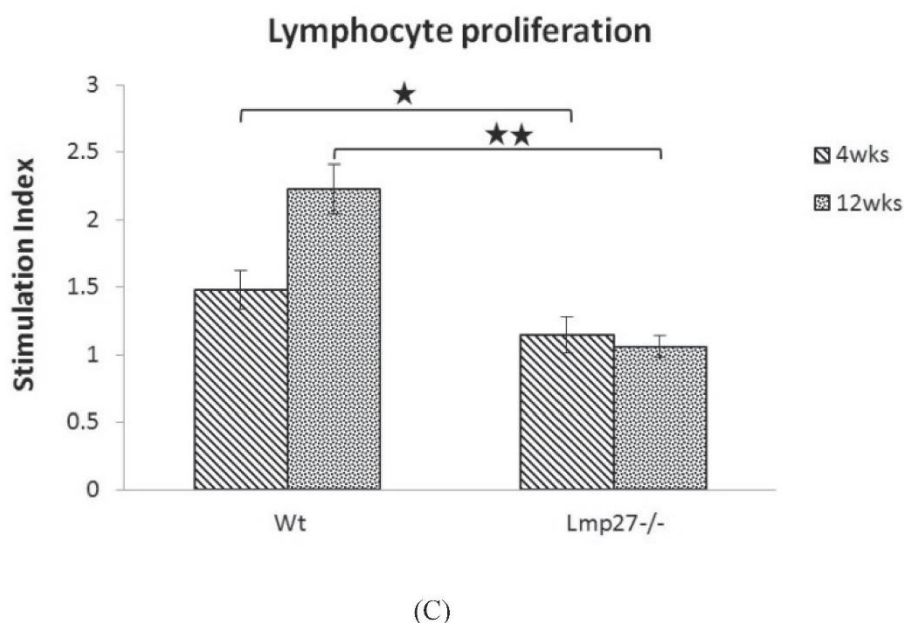


**Figura 9:** Resultados da medição das concentrações das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 produzidas pelos glóbulos brancos do baço, utilizando o método ELISA sanduíche, após 4 e 12 semanas. PBS foi utilizado como grupo de controlo negativo \*p < 0.01, \*\*p < 0.001 (adaptado de <sup>16</sup>)

Os resultados obtidos (Fig.9) mostraram que na quarta semana após inoculação com *Lmp27<sup>-/-</sup>*, a produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 aumentou significativamente, embora menos comparativamente ao grupo Wt. Na semana 12, houve uma diminuição dos níveis de IL-4 associado a Th2 no grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>*.

Tanto a proporção de IFN- $\gamma$ /IL-4, como a inclinação Th1/Th2, doze semanas após a inoculação, confirmaram uma resposta Th1 no grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>* e uma resposta Th2 no grupo Wt.<sup>16</sup> De facto, uma resposta Th2 mais elevada no grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>* é aquilo que se pretende uma vez que estudos anteriores demonstraram que esta resposta está associada a uma evolução positiva da doença.

A proliferação linfocitária foi também analisada utilizando o ensaio de redução de brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MTT), um ensaio colorimétrico muito utilizado para medir a proliferação celular. Neste ensaio foi avaliada a resposta proliferativa das células do baço contra um antígeno solúvel de *Leishmania* (ASL), na semana 4 e 12 após inoculação (Fig.10).<sup>16</sup>

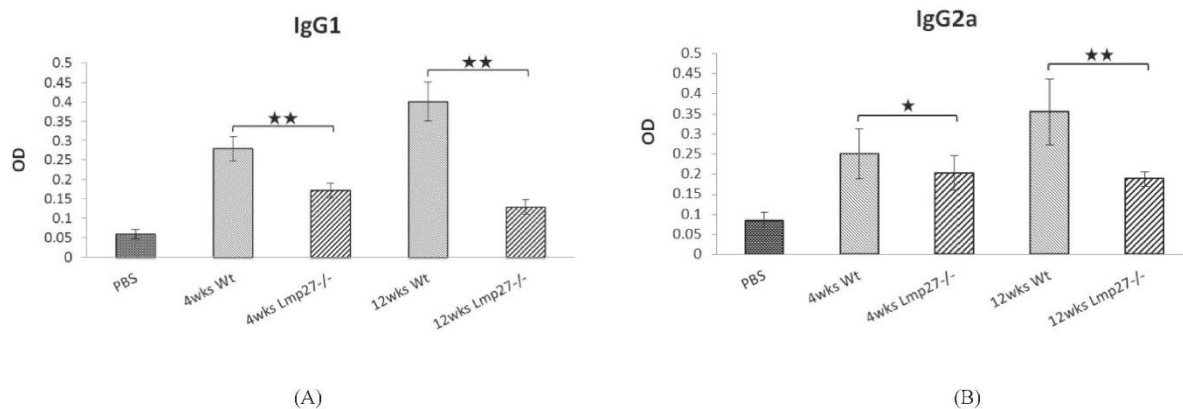


**Figura 10:** Resultados obtidos na determinação da proliferação linfocitária utilizando o Teste MTT, 4 e 12 semanas após inoculação (adaptado de <sup>16</sup>)

Os resultados (Fig.10) demonstram que o grupo Wt apresentou um Índice de Estimulação (IE) significativamente mais alto comparativamente ao grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>*, o que significa que no grupo Wt foi induzida uma resposta imunitária contra o parasita mais forte. Estes resultados vêm a confirmar os dados obtidos anteriormente relativamente à produção de citocinas pelo baço (Fig.9), onde se verifica que tanto o grupo Wt como o grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>* induziram resposta imunitária Th1 e Th2, no entanto, tanto os valores de Th1 como de Th2 são superiores no grupo de animais infetados com os parasitas Wt.

Ensaio relativamente à resposta imunológica Th1/Th2 foram realizados 4 e 12 semanas após inoculação. Para esta avaliação foi colhido sangue de um corte realizado na cauda dos ratos, de modo a medir os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania* recorrendo ao ensaio ELISA. (Fig.11)<sup>16</sup>

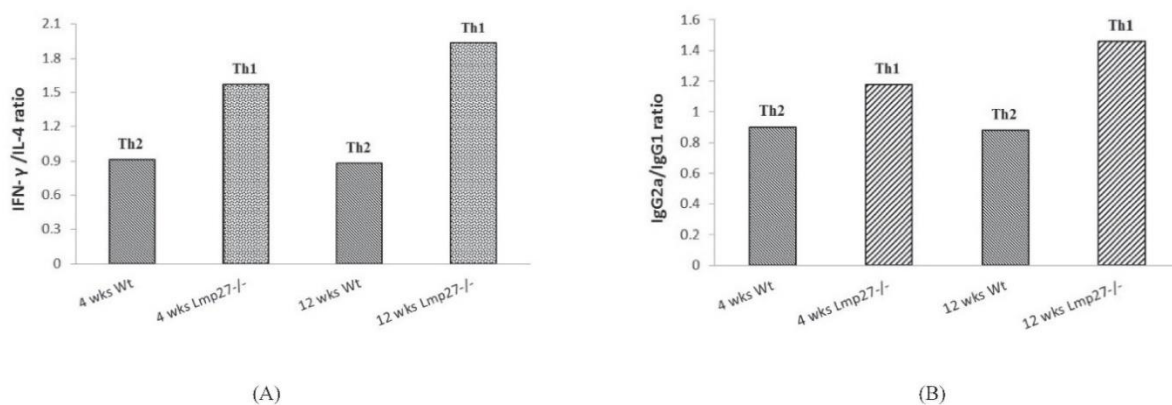




**Figura 11:** Resultados obtidos da determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a, pelo método ELISA, 4 e 12 semanas após inoculação dos ratos BALB/c com *Lmp27<sup>-/-</sup>* e Wt. PBS foi utilizado como grupo de controlo negativo. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  (adaptado de <sup>16</sup>)

Os resultados obtidos (Fig.11) demonstraram que, após 4 semanas, os níveis de anticorpos aumentaram, tanto no grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>* como no grupo Wt. Para além disso, é possível verificar que no grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>* houve uma maior produção de anticorpos IgG2a do que IgG1 e o oposto para o grupo Wt.<sup>16</sup>

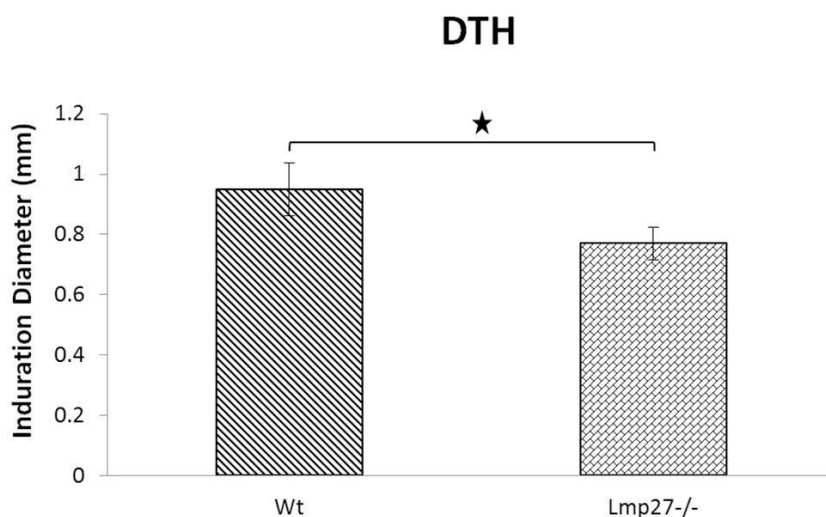
Com os dados obtidos anteriormente relativamente à determinação de citocinas (Fig.9) e de anticorpos (Fig.11), foi possível obter a relação de respostas Th1/Th2 de ambos os grupos (Fig.12).



**Figura 12:** Relação da resposta Th1/Th2 do grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>* e do grupo Wt, tendo em consideração os resultados obtidos anteriormente na determinação dos anticorpos (Fig.7) e das citocinas (Fig.5) (adaptado de <sup>16</sup>)

A análise dos gráficos (Fig.12) mostra-nos que após 12 semanas, o rácio IgG2a/IgG1, bem como o rácio IFN- $\gamma$ /IL-4 foi significativamente superior no grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>* comparativamente ao grupo Wt, indicando uma resposta tipo Th1. Pelo contrário (Fig. 12), o grupo inoculado com *Leishmania major* Wt, obteve sobretudo uma resposta Th2.<sup>16</sup>

Para finalizar foi realizado o teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo retardado (DTH) (Fig. 13), que é um teste *in vivo* baseado na resposta inflamatória que se desenvolve 24 a 72 horas após a injeção intradérmica de um antigénio, cujo sistema imunológico reconhece como estranho. Neste tipo de respostas estão envolvidas principalmente células T e macrófagos em vez de anticorpos.<sup>16</sup>



**Figura 13:** Resultados obtidos no teste de hipersensibilidade do tipo retardado (DTH) (adaptado de <sup>16</sup>)

Os resultados obtidos (Fig. 13) demonstram que houve uma resposta DHT significativamente mais alta no grupo Wt, comparativamente ao grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>*.<sup>16</sup>

Os parasitas *Lmp27<sup>-/-</sup>* não proliferam em culturas contendo macrófagos de ratos BALB/c uma vez que a proteína p27 é fundamental na proliferação de *L. major* em células de mamíferos. No entanto, neste estudo verificámos que *Lmp27<sup>-/-</sup>* foi capaz de sobreviver e proliferar, embora a uma taxa mais lenta comparativamente aos parasitas Wt.<sup>16</sup>

Sabe-se que os promastigotas utilizam essencialmente a glicose como fonte primária de energia, enquanto os amastigotas intracelulares utilizam principalmente aminoácidos e ácidos gordos como fonte de carbono para a proliferação dentro das células hospedeiras, daí que o gene p27 seja altamente expresso em amastigotas e promastigotas metacíclicos.<sup>16</sup>

Neste estudo verificou-se que os amastigotas foram incapazes de se proliferar, o que poderá ser explicado pela interrupção do ciclo do ácido cítrico e da respiração mitocondrial, processos fundamentais para a sobrevivência e propagação do parasita. No entanto, foram capazes de sobreviver em macrófagos, o que significa que esta interrupção foi apenas parcial e não total. Esta incapacidade de proliferação e capacidade de sobrevivência de *Lmp27<sup>-/-</sup>* poderá ser uma vantagem para sua utilização em vacinas, uma vez que a sua deficiência proliferativa indica que houve redução da virulência do parasita (tal como se pretende numa

vacina atenuada), no entanto, a sua sobrevivência leva a uma estimulação contínua do sistema imunológico.<sup>16</sup>

Em geral os resultados demonstraram que os parasitas *Lmp27<sup>-/-</sup>* estimularam o sistema imunológico dos ratos BALB/c, no entanto, menos do que os parasitas Wt.<sup>16</sup>

Os resultados obtidos relativamente às citocinas e anticorpos sugeriu que o grupo *Lmp27<sup>-/-</sup>* apresentou uma imunidade mediada essencialmente por células do tipo Th1. Estudos anteriores já tinham relatado que em parasitas geneticamente modificados com deficiência em proteases de cisteína não há produção de IL-4 e, portanto, a resposta Th1 desenvolve-se e a lesão desaparece, tal como aconteceu com os mutantes *Lmp27<sup>-/-</sup>* que não proliferaram nem induziram uma resposta Th2 como o grupo Wt, no entanto, como permaneceram dentro dos macrófagos, estimularam uma resposta celular imunológica do tipo Th1 sem provocar sintomas.<sup>16</sup>

Por outro lado, o parasita Wt teve alta proliferação celular, sendo que os dados obtidos na avaliação da resposta DTH, poderão ser explicados pelo facto de estes terem sobrevivido durante um longo período de tempo nos ratos infetados e, portanto, induziram respostas Th1 mais fortes comparativamente à estirpe mutante *Lmp27<sup>-/-</sup>*.<sup>16</sup>

Este estudo permitiu percebermos a importância do gene p27 para a sobrevivência e proliferação de *L. major* em células de mamíferos e que, tal como este, possivelmente existem outros genes ou proteínas essenciais ao parasita, ainda por estudar que poderão constituir vacinas atenuadas seguras na prevenção da leishmaniose canina. Este estudo foi realizado *in vitro* utilizando ratos e por isso será necessário a realização de mais estudos para percebermos a verdadeira eficácia e segurança desta vacina em cães, no entanto, os resultados foram bastante satisfatórios uma vez que esta estirpe atenuada demonstrou ser segura e imunogénica.

## 4. DIAGNÓSTICO

### 4.1. Sinais e sintomas

Os sinais e sintomas da LCan são amplamente variáveis devido aos inúmeros mecanismos patogénicos do parasita, dos órgãos que são afetados e da capacidade de resposta imune de cada hospedeiro.<sup>3</sup>

Como já foi referido anteriormente, a leishmaniose em cães é normalmente sistémica, e como tal, pode afetar órgãos, tecidos e fluídos biológicos que posteriormente se manifestam em sinais e sintomas clínicos comuns a várias outras patologias e, portanto, bastante inespecíficos desta doença.<sup>3</sup>

As lesões cutâneas são manifestações muito comuns em cães com leishmaniose e podem estar isoladas, em concomitância com outros sinais clínicos e/ou anormalidades clínico-patológicas, mas também podem estar ausentes.<sup>3</sup>

Em cães infetados é de extrema importância a avaliação da função renal, uma vez que há uma grande prevalência de doença renal crônica na LCan, sendo uma das manifestações mais graves e a principal causa de morte de animais seropositivos. O diagnóstico precoce de doença renal e o rastreamento da sua evolução são medidas fundamentais, pois uma proteinúria leve pode progredir para síndrome nefrótica ou mesmo doença renal terminal.<sup>3</sup>

Para além das manifestações mais comuns da doença por vezes são encontrados sinais e sintomas atípicos tais como: despigmentações, lesões na mucosa oral, lesões nos ossos, hepatites crônicas, doenças neurológicas como meningite e miosite muscular mastigatória, doenças autoimunes, entre outras.<sup>3</sup>

Na tabela seguinte (Tabela 2) encontram-se algumas manifestações clínicas e alterações laboratoriais encontradas na LCan devido a *L. infantum*.<sup>6</sup>

**Tabela 2:** Manifestações clínicas e alterações laboratoriais encontradas na LCan devido a *L. infantum* (adaptado de <sup>6</sup>)

<b>Manifestações clínicas</b>
<u>GERAIS</u>
- Linfadenomegalia generalizada
- Pera de peso corporal
- Diminuição ou aumento do apetite
- Letargia
- Membranas mucosas pálidas
- Esplenomegalia
- Poliúria e polidipsia
- Febre
- Vômito
- Diarreia
<u>CUTÂNEAS</u>
- Dermatite esfoliativa não prurítica, com ou sem alopecia
- Dermatite erosiva/ulcerativa
- Dermatite nodular
- Dermatite papular
- Dermatite pustular
- Onicogribose

### OCULARES

- Blefarite (esfoliativa, ulcerativa ou nodular) e conjuntivite (nodular)
- Ceratoconjuntivite (comum ou seca)
- Uveíte anterior
- Endoftalmite

### OUTRAS

- Lesões ulcerativas ou nodulares mucocutâneas e das mucosas (oral, genital e nasal)
- Epistaxe
- Claudicação (poliartrite erosiva ou não erosiva, osteomielite e polimiosite)
- Miosite atrófica dos músculos mastigadores
- Vasculopatias (vasculite sistémica e tromboembolismo arterial)
- Alterações neurológicas

### **Alterações laboratoriais**

#### HEMOGRAMA/HEMÓSTASE

- Anemia não regenerativa ligeira a moderada
- Leucocitose ou leucopenia: linfopenia, neutrofilia, neutropenia
- Trombocitopatia
- Trombocitopenia
- Redução da hemóstase secundária e da fibrinólise

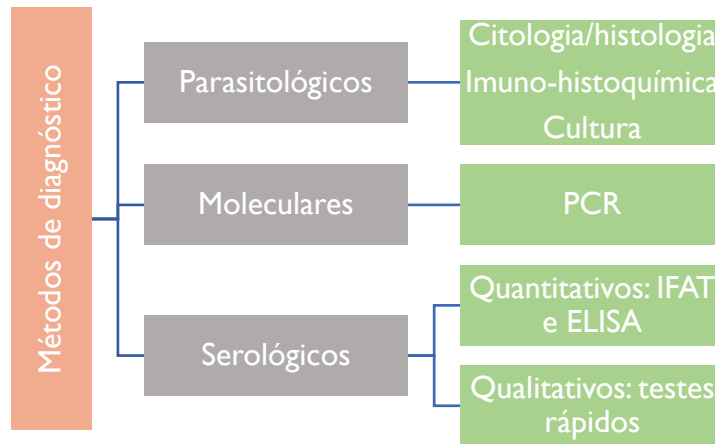
#### PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO COM ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

- Hiperproteinemia
- Hiperglobulinemia (beta- e/ou gamaglobulinemia policlonais)
- Hipoalbuminemia
- Diminuição do rácio albuminas:globulinas
- Azotemia renal
- Atividade aumentada de enzimas hepáticas
- Proteinúria

## **4.2. Abordagem clínica do diagnóstico**

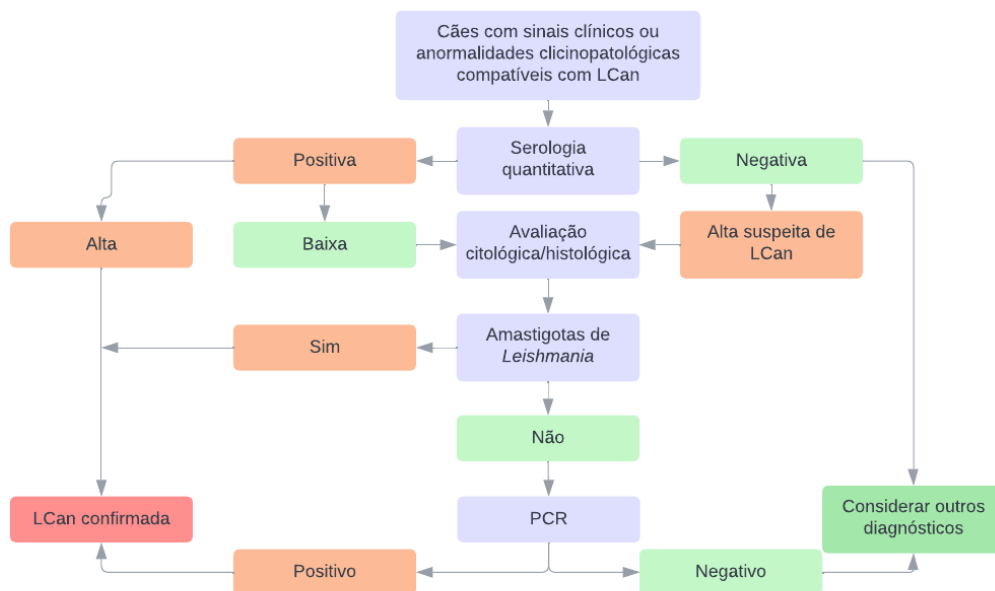
O diagnóstico de LCan baseia-se em sinais clínicos e/ou alterações laboratoriais (Tabela 2) com posterior confirmação recorrendo a técnicas serológicas ou moleculares (Fig. 14).<sup>6</sup>

Os cães com infecção por *L. infantum* nem sempre apresentam sinais clínicos evidentes nem alterações laboratoriais compatíveis com a doença, o que pode levar a diagnósticos tardios e progressão para uma infecção clínica.<sup>6</sup>



**Figura 14:** Métodos de diagnóstico da LCan (adaptado de <sup>6</sup>)

De todas as técnicas utilizadas no diagnóstico de LCan, o PCR em tempo real é a técnica mais sensível. Relativamente às amostras mais sensíveis que poderão ser utilizadas nesta técnica temos: medula óssea, linfonodo, baço, pele e secreção da conjuntiva. Quanto às amostras menos sensíveis temos: urina, sangue e “buffy coat”.<sup>6</sup>



**Figura 15:** Abordagem clínica de diagnóstico de LCan (adaptado de <sup>17</sup>)

## 5. TRATAMENTO

### 5.1. Limitações do tratamento atual contra LCan

O tratamento da LCan atualmente existente não é capaz de eliminar o parasita por completo, atuando apenas na amenização dos sintomas e da progressão da doença. Para além disso, muitos dos fármacos que atualmente são utilizados apresentam diversas limitações tais como: elevada toxicidade, necessidade de administração prolongada, elevado custo, dificuldade na administração e, por vezes, não são capazes de ultrapassar as barreiras de resistência do parasita. Por esse motivo, é cada vez mais importante a pesquisa de novas moléculas e novos alvos de atuação.<sup>18</sup>

Tanto as células do parasita como as células do hospedeiro são organismos eucariotas e, portanto, o metabolismo celular é bastante semelhante, o que dificulta a pesquisa de alvos metabólicos no parasita.<sup>18</sup>

O conhecimento de enzimas metabólicas do parasita diferentes ou que estejam ausentes no hospedeiro é um grande passo na descoberta de novas moléculas, pois vai permitir que os parasitas sejam eliminados seletivamente sem causar danos nas células hospedeiras. As enzimas mais estudadas atualmente que demonstraram ter características que diferem significativamente nos parasitas e da célula hospedeira são:<sup>18</sup>

- Ornitina descarboxilase (ODC), S-adenosil-L-metionina descarboxilase e espermidina sintetase da biossíntese de poliaminas
- Tripanotiona redutase (TR) do sistema de óxido-redução
- Óxido nítrico sintase (NOS) e arginase do metabolismo da L-arginina
- C14-desmetilase e esqualento sintase da biossíntese do ergosterol
- Dihidrofolato redutase (DHFR) e pteridina redutase (PTR) do metabolismo dos folatos
- DNA topoisomerases

Outra das dificuldades que surgem relativamente à descoberta de tratamentos realmente eficazes contra LCan está relacionada com as resistências contra os fármacos, pelo parasita. Estas resistências são muitas vezes potenciadas pelo aumento crescente das doses, frequências elevadas na administração dos fármacos ou até mesmo pela longa duração do tratamento, para além dos mecanismos naturais de resistência do próprio parasita. Algumas das resistências atualmente conhecidas são:<sup>18</sup>

- Aumento de transportadores ABC como a glicoproteína P específica (Pgp) → responsável pela eliminação de compostos através da membrana celular, secreção da hormona esteróide ergosterol, distribuição de fosfolípidos e transporte de ATP.

- Aumento intracelular excessivo dos níveis da tripanotona → impede a apoptose do parasita pelos compostos de antimônio
- Sobreexpressão da triparedoxina peroxidase → resistência do parasita a compostos de antimônio trivalentes (*in vitro*)
- Diminuição do potencial de membrana mitocondrial → redução da concentração do fármaco
- Modificações na composição lipídica de membrana e na biossíntese de ergosterol → resistência à miltefosina e anfotericina B

## 5.2. Fármacos anti-*Leishmania*

### 5.2.1. Análogos de purinas

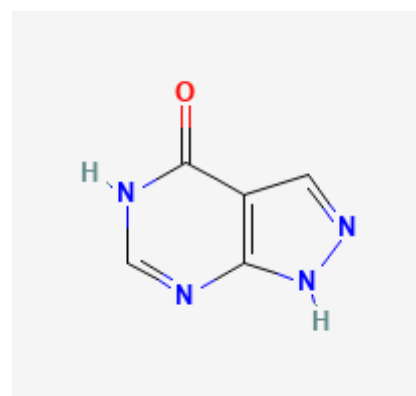
#### 5.2.1.1. Alopurinol

O alopurinol é um inibidor da xantina oxidase, responsável pela inibição da síntese de ácido úrico, ou seja, impede a transição da hipoxantina a xantina e da xantina a ácido úrico, sendo utilizado em humanos no tratamento profilático da gota, uma patologia caracterizada pelo aumento de ácido úrico no sangue.<sup>19</sup>

Ele é utilizado no tratamento de LV canina como leishmanioestático, normalmente em combinação com outros fármacos, mas também pode ser utilizado isoladamente. Alguns análogos de purinas, como é o caso do alopurinol, são metabolizados pelos parasitas a análogos tóxicos que interrompem a síntese de proteínas e incorporam-se no seu RNA, exercendo um efeito inibitório no crescimento de *Leishmania*.<sup>20</sup>

A duração do tratamento com alopurinol depende de vários fatores como: gravidade da doença, resposta clínica ao tratamento e tolerância individual ao fármaco. Cães extremamente suscetíveis podem ter que prolongar o tratamento para o resto da vida, no entanto, quando os animais apresentam evidências de recuperação comprovadas por hemograma, testes bioquímicos e urinálise, bem como uma diminuição acentuada dos anticorpos, o tratamento poderá ser interrompido.<sup>17</sup>

Cães a realizar tratamento com alopurinol devem fazer uma dieta com baixo teor de purinas (proteínas), de modo a evitar o aparecimento de xantinúria ou urotilíase. Nos casos em que não é possível controlar a xantinúria apenas com base na dieta, o tratamento deve ser interrompido.<sup>17</sup>



**Figura 16:** Estrutura molecular do alopurinol (PubChem)



## 5.2.2. Compostos de antimônio

### 5.2.2.1. Antimoniato de Meglumina e Estibogluconato de Sódio

O Antimoniato de Meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) é um composto de antimônio pentavalente (SbV) utilizado em todos os tipos de leishmaniose (LV, LC e LMC), sendo recomendado como tratamento de primeira linha pela Organização Mundial de Saúde (OMS).<sup>21</sup>

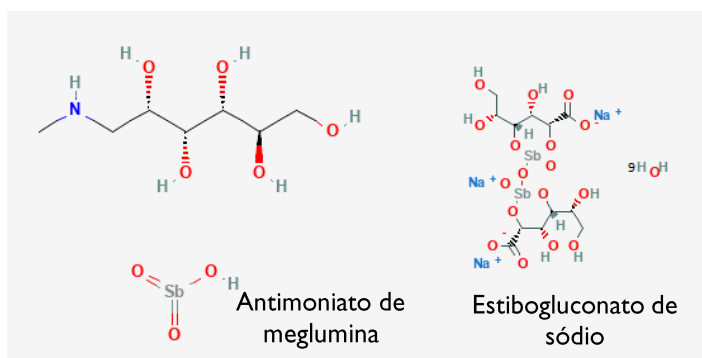
Este composto apresenta efeito leishmanicida, embora o seu mecanismo de ação ainda não esteja totalmente compreendido. No entanto, alguns investigadores sugerem que possa estar relacionado com a sua conversão em antimônio trivalente (SbIII), uma forma tóxica que exerce ação leishmanicida contra amastigotas do parasita. De facto, estudos demonstraram que o antimoniato de meglumina causa danos no DNA *in vivo*, mas não *in vitro*, o que significa que SbV necessita de metabolização para exercer a sua atividade mutagénica.<sup>21</sup>

Outros investigadores sugerem que possa estar relacionado com interferências no metabolismo de amastigotas de *Leishmania*, onde há formação de complexos que interferem na  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos e na glicólise do parasita, promovendo a depleção de ATP intracelular.<sup>21</sup>

Outro composto de antimônio pentavalente usado em alguns países para o tratamento contra a leishmaniose canina é o Estibogluconato de Sódio (Pentostam<sup>®</sup>) que, tal como anterior, também exerce atividade no metabolismo do parasita, interferindo na  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos e na inibição de enzimas glicolíticas.

Em certos países foram relatadas resistências de *L. infantum* aos compostos de antimônio pentavalentes que têm sido grande preocupação nos últimos tempos. Outra desvantagem destas substâncias é o seu elevado custo.<sup>22</sup>

Dois dos efeitos mais comuns após administração de compostos de antimônio são a dor no local da injeção e nefrotoxicidade, aquando de tratamentos prolongados.<sup>22</sup>



**Figura 17:** Estruturas moleculares: Antimoniato de meglumina e Estibogluconato de sódio (PubChem)

### 5.2.3. Derivados de Alquilofosfocolina

#### 5.2.3.1. Miltefosina

A miltefosina (Milteforan<sup>®</sup>) foi inicialmente desenvolvida como fármaco antineoplásico para humanos e só posteriormente foi estudada a sua aplicabilidade em cães no tratamento da LV. A ação anti-*Leishmania* desta molécula parece estar envolvida com a inibição da penetração dos parasitas nos macrófagos, através da interação com glicosomas e recetores de glicosil-fosfatil-inositol que são essenciais para a sobrevivência de *Leishmania* dentro das células.<sup>23</sup> Por outro lado, exerce ação inibitória de fosfolípidos e da proteinoquinase C, levando a uma quebra na transdução do sinal de membrana do parasita.<sup>24</sup>

Adicionalmente, a ação metabólica deste composto parece afetar a síntese de glicolípidos e glicoproteínas da membrana do parasita, causando apoptose.<sup>24</sup>

Uma das grandes vantagens deste fármaco é o facto de apresentar baixa toxicidade e a sua administração ser feita por via oral, embora possa causar alguns efeitos secundários gastrointestinais e por isso recomenda-se a administração concomitante com alimentos.

Este fármaco está indicado no tratamento de animais com proteinúria e/ou doença renal.<sup>23</sup>

Estudos revelaram que a miltefosina exerce o efeito pretendido, quer seja administrada isoladamente, ou combinada com outras terapêuticas e que é capaz de reduzir os sinais de infeção causados por *L. infantum*, bem como a carga parasitária.<sup>24</sup>

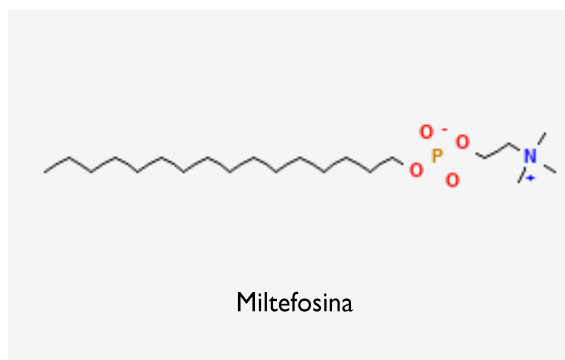


Figura 18: Estrutura molecular da Miltefosina (PubChem)

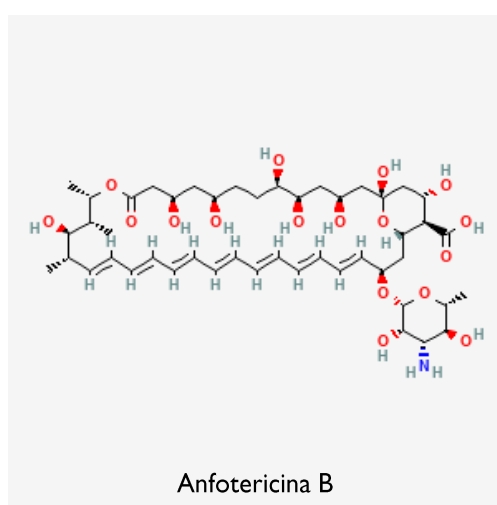
#### 5.2.4. Anfotericina B

A Anfotericina B (AnfB) (Fungizone<sup>®</sup>) é principalmente utilizada como antifúngico, no entanto, possui atividade contra algumas espécies de *Leishmania*. Pertence à classe dos macrólidos e é produzida por *Streptomyces nodosus*.<sup>22</sup>

Este fármaco atua por ligação ao ergosterol das membranas celulares do parasita, alterando a sua permeabilidade ao potássio intracelular.<sup>22</sup>

Apesar de ter baixa afinidade com o colesterol (esteróide principal nas membranas celulares dos mamíferos), a AnfB pode induzir nefrotoxicidade por vasoconstrição renal e possivelmente também exerce uma ação direta em células epiteliais renais. Mais tarde surgiram também as AnfB associadas a lípidos, com o objetivo de diminuir a nefrotoxicidade e, para além disso, apresentam a vantagem de poderem ser administradas em doses maiores, com menos frequência. Apesar de tudo, o uso destas fórmulas ainda é muito limitado pois são formulações extremamente caras e ainda há algumas contradições relativamente à eficácia destas moléculas na LCan.<sup>22</sup>

Esta molécula é muitas vezes a primeira escolha, nos casos em que já existem resistências aos compostos de antimónio pentavalentes.<sup>22</sup>

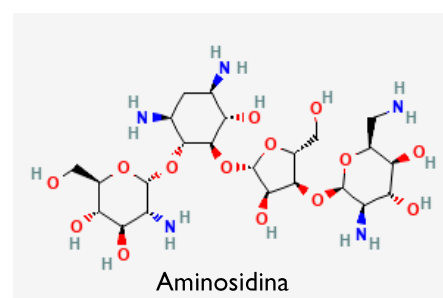


**Figura 19:** Estrutura molecular da Anfotericina B (PubChem)

### 5.2.5. Aminosidina

A Aminosidina pertence à classe dos antibióticos aminoglicosídeos e é por vezes utilizada como adjuvante no tratamento da leishmaniose canina. Atua contra promastigotas de *Leishmania* bloqueando a associação entre subunidades ribossomais, o que leva a uma disfunção respiratória do parasita.<sup>22</sup>

Apesar da sua eficácia e melhoria clínica dos animais após tratamento com este fármaco, ocorrem muitas recidivas. Por outro lado, há uma grande limitação na sua utilização devido à toxicidade renal que apresenta, principalmente quando combinada com outros fármacos, como os compostos de antimónio pentavalentes.<sup>22</sup>



**Figura 20:** Estrutura molecular da Aminosidina (PubChem)

## 5.2.6. Fluoroquinolonas

### 5.2.6.1. Marbofloxacina

As fluoroquinolonas como a Marbofloxacina são outra classe de antibióticos que atuam na inibição da DNA girase e nas topoisomerases das bactérias, provocando o seu efeito bactericida. A estrutura da membrana de *Leishmania* apresenta semelhanças com a parede das bactérias, tendo conduzindo investigadores a estudá-la como potencial tratamento da LCan. Estudos *in vitro* demonstraram que estas apresentam atividade contra promastigotas de *L. infantum* em macrófagos de cães infetados.<sup>25</sup>

Uma das vantagens destas moléculas comparativamente a moléculas anteriormente referidas, é o facto de apresentarem baixa toxicidade, mesmo sendo administradas oralmente, sendo uma mais-valia para o tratamento de cães com leishmaniose com comprometimento renal.<sup>25</sup>

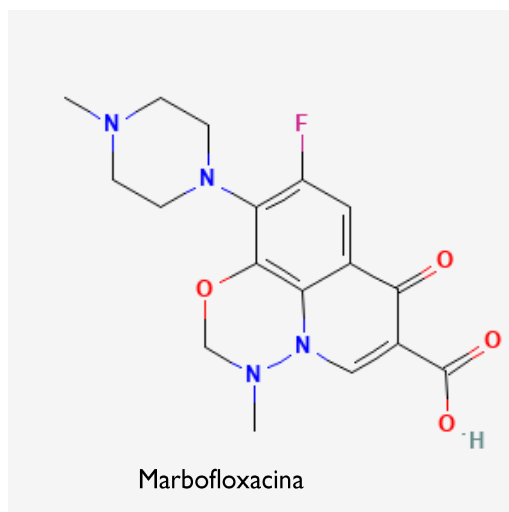


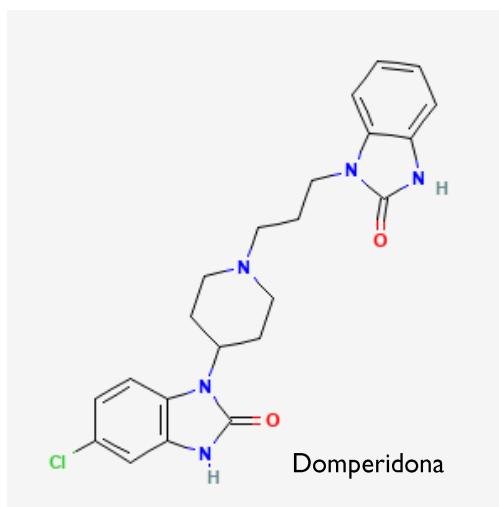
Figura 21: Estrutura molecular da Marbofloxacina (PubChem)

## 5.2.7. Domperidona

A domperidona é um antagonista dos recetores D2 da dopamina com propriedades antieméticas, que promove a libertação de serotonina, estimulando a produção de prolactina. A prolactina é uma citocina pró-inflamatória que estimula a produção de linfócitos Th1, IL-2, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , levando à ativação de macrófagos com conseqüente decréscimo de Th2 e TNF- $\beta$ , ou seja, atua no aumento da resposta celular imunológica.<sup>11</sup>

Estudos realizados demonstraram a eficácia deste fármaco na leishmaniose canina, tanto na redução do risco de desenvolvimento de uma infeção ativa e doença clínica após contacto com o parasita, como também no controlo da progressão da doença em cães sintomáticos.<sup>11</sup>

Este fármaco entrou no mercado em 2012, com o nome de Leisguard® e tem a vantagem de ser menos dispendioso comparativamente com outros fármacos, para além disso pode ser administrado oralmente.<sup>11</sup>



**Figura 22:** Estrutura molecular da Domperidona (PubChem)

### 5.3. Combinação de fármacos

Algumas combinações de fármacos revelaram uma maior eficácia no tratamento dos cães infetados com LCan quando comparada à sua administração isolada, no entanto, existem outras combinações que podem aumentar a toxicidade renal como é o caso da administração de Aminosidina combinada com compostos de antiamónio pentavalentes.<sup>22</sup>

As combinações mais comuns são:

- Alopurinol com Antimoniato de Meglumina – demonstraram grande eficácia no tratamento de LCan, tendo reduzido os sinais clínicos e conduzido a bons prognósticos, o que é exetável tendo em conta que exercem atividades complementares, uma vez que o alopurinol atua na inibição do crescimento do parasita e o antimoniato de meglumina como leishmanicida. Esta combinação é muito utilizada em medicina veterinária<sup>20,21,26</sup>
- Alopurinol e Miltefosina – Comparativamente à combinação anterior, apresentam menor toxicidade e contornam as limitações de resistência dos compostos de antimónio.<sup>26</sup>

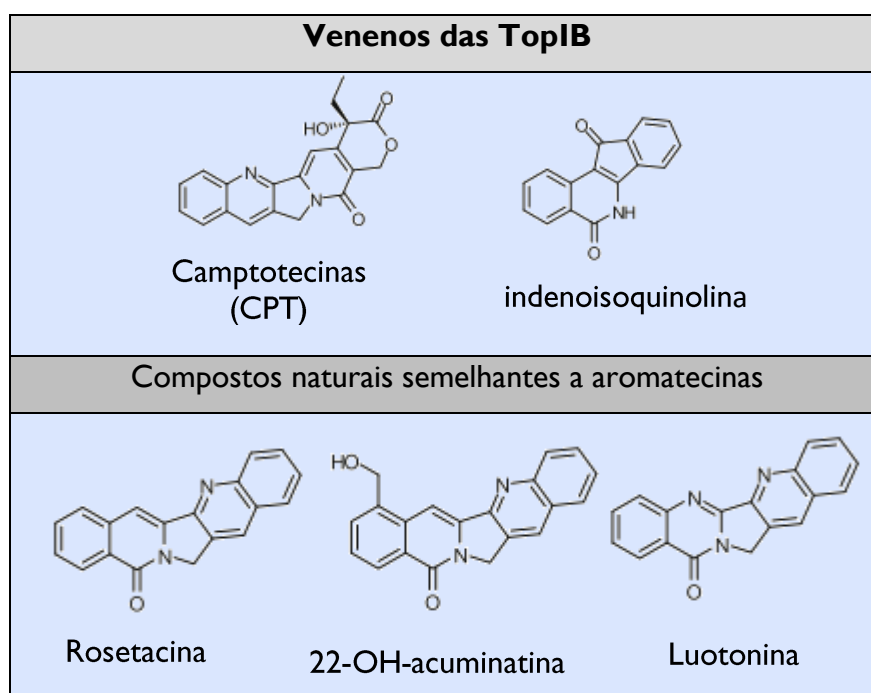
### 5.4. Aromatecinas sintéticas

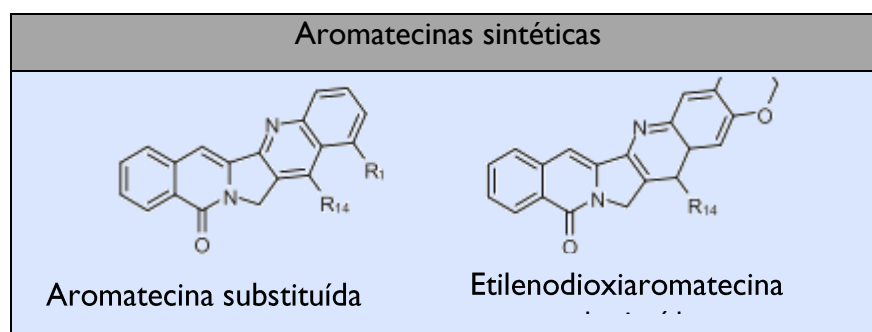
A topoisomerase IB de DNA (TopIB) é uma enzima responsável pela diminuição das tensões que ocorrem durante os processos de desenrolamento das cadeias de DNA,

induzindo uma quebra transitória nas cadeias. Esta quebra transitória é promovida pela atividade catalítica desta enzima, onde ocorre um ataque nucleofílico à ligação fosfodiéster que existe entre os nucleótidos do DNA, por meio de um resíduo catalítico tirosil, que por sua vez forma uma ligação covalente entre o fosfato e a tirosina. Devido à sua importância e capacidade de manipular as cadeias de DNA, estas enzimas têm sido estudadas para o desenvolvimento de novos fármacos contra o cancro e doenças infecciosas.<sup>27</sup>

A TopIB da *Leishmania* (LTopIB) possui uma estrutura heterodimérica, ao contrário das restantes espécies animais que apresentam uma TopIB monomérica, o que tem revelado grande interesse do ponto de vista terapêutico.<sup>27</sup>

Dentro dos inibidores da TopIB, temos os “venenos” de TopIB (Fig.23) que demonstraram eficácia como leishmanicidas e temos também os inibidores catalíticos. Os “venenos” de TopIB vão aumentar a atividade da enzima, geram quebras nas cadeias de DNA e promovem a formação de uma ligação covalente entre ela e o DNA. Como consequência temos um aumento na quebra da molécula, que irá formar intermediários com propriedades letais e mutagénicas, desfavoráveis ao metabolismo celular. Estes intermediários podem agir inibindo a atividade da enzima, impedindo a junção das cadeias de DNA após clivagem, ou podem agir aumentando os níveis de cisão. Por outro lado, alguns venenos de topoisomerase, têm a capacidade de se intercalar entre as bases da cadeia nucleotídica, aumentando o tempo vida do complexo enzima-DNA, causado pelo “veneno” de topoisomerases. Os inibidores catalíticos, em vez de aumentarem a atividade da enzima, vão impedir a atividade da mesma, não havendo formação do complexo enzima-DNA.<sup>27</sup>





**Figura 23:** Estrutura química dos venenos das TopIB: CPT, indenoisoquinolina, compostos naturais semelhantes a aromatecinas (luotonina A, rosetacina e 22-OH-acumantetina) e aromatecinas sintéticas usadas para o estudo, com posições relevantes numeradas (adaptado de <sup>27</sup>)

As aromatecinas são uma nova classe de “veneno” de topoisomerases descritas como híbridos estáveis de indenoisoquinolinas e camptotecinas (CPT) e que apresentam semelhanças com a luotonina A, um “veneno” TopIB natural, mais fraco.<sup>27</sup>

Foram estudadas várias substituições e modificações estruturais, sendo que alguns análogos possuem maior atividade proliferativa que o composto original. Foi verificado que as substituições em C14 estavam relacionadas a um aumento da atividade anticancerígena, e a ponte etilenodioxo entre o C2 e C3 a uma maior atividade antiparasitária contra *Trypanosoma*.<sup>27</sup>

As aromatecinas (inibidores TopIB não CPT) surgiram com o objetivo de ultrapassar algumas limitações que os análogos de CPT apresentavam. No caso da *Leishmania*, existem dois mecanismos de resistência à CPT, um em que ocorre a sobreexpressão do transportador ABCG6, e outro onde ocorre a substituição de aminoácidos Gly185Arg e Asp325Glu na grande subunidade da enzima LTopIB.<sup>27</sup>

Um estudo realizado pela Universidade de León em Espanha utilizou duas séries de aromatecinas, de modo a estudar a sua eficácia como inibidores de LTopIB contra promastigotas de vida livre e amastigotas intracelulares de *L. infantum* e ainda a capacidade de estes superarem os transportadores envolvidos na resistência de CPT. No caso dos amastigotas intracelulares, foram utilizadas células esplênicas de murganhos BALB/c infetados. Para isso utilizaram também uma estirpe de *L. infantum* geneticamente modificada para produzir a proteína iRFP, uma proteína que emite fluorescência a 708 nm.<sup>27</sup>

Nas aromatecinas utilizadas (Fig. 24) foram incluídos diferentes substituintes na posição C14 tais como aminas, aminoálcoois e heterociclos nitrogenados com o intuito de aumentar a solubilidade e estabilidade do complexo DNA-enzima. Para além disso, nas aromatecinas 7, 8, 9 e 10 foi adicionada uma ponte etilenodioxo entre o C2 e o C3 para melhorar a atividade inibitória desses compostos.<sup>27</sup>

Foram determinados os valores de  $EC_{50}$ , ou seja, a concentração de fármaco que exerce metade do seu efeito máximo, o que permite não só avaliar a eficácia dos compostos bem como o intervalo de segurança dos mesmos. Todos os compostos demonstraram valores menores de  $EC_{50}$  em amastigotas, comparativamente aos promastigotas.

A ponte de etilenodioxí não demonstrou qualquer efeito significativo relativo à potência anti-*Leishmania*, pois comparando o composto 1 e 9 com a mesma substituição em C-14, mas com uma ponte de etilenodioxil no composto 9, foi verificado que a inibição da enzima com o composto 1, ocorre com concentrações muito mais baixas. Relativamente à inibição de LTopIB, os compostos 1, 3, 4, 5 e 7 mostraram uma inibição parcial da topoisomerase que não demonstrou ser dependente de concentração.<sup>27</sup>

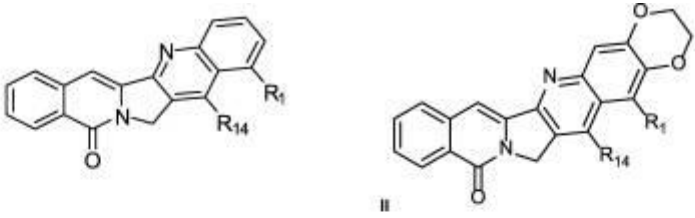
Apenas no composto 8 foi observada uma banda fraca de DNA cortado o que sugere que a maioria destes compostos atuam como inibidores e não como “venenos” de LTopIB. A total inibição da enzima foi observada com alta concentração de aromatecinas 3, 7 e 9.<sup>27</sup>

Os compostos 6 e 10 não apresentaram qualquer efeito inibitório, podendo estar outros alvos envolvidos.<sup>27</sup>

Quanto aos testes para avaliar se estas aromatecinas também tinham os mesmos problemas relativamente aos transportadores envolvidos na resistência ao CPT, foi produzida uma estirpe de *L. infantum* resistente a CPT (CPT-20). Verificou-se que CPT-20 foi suscetível às aromatecinas estudadas apresentando valores de  $EC_{50}$  muito semelhantes aos obtidos com *L. infantum*-iRFP. Por outro lado, a amplificação e sequenciamento dos genes codificadores de LTopIB das estirpes CPT-20 e das estirpes Wt, não demonstrou qualquer diferença entre eles. O mecanismo de resistência de CPT-20 estaria muito provavelmente relacionado com a superexpressão do transportador ABCG6, responsável pelo efluxo de moléculas envolvidas no mecanismo de resistência do CPT. Os resultados demonstraram, portanto, que as aromatecinas superam o efluxo potenciado por este transportador.<sup>27</sup>

Em geral as aromatecinas testadas comprovaram a sua eficácia contra *Leishmania infantum*, e o seu comportamento pode estar relacionado com a existência de um outro mecanismo complementar ao mecanismo de “veneno” de LTopIB ou às diferenças estruturais entre a LTopIB e a TopIB do mamífero. Estas diferenças poderão ser vantajosas a nível da projeção de novas moléculas com capacidade de superar o transportador ABCG6 que está envolvido na resistência do CPT.<sup>27</sup>





Compound	Series	R14	R1	EC <sub>50</sub> (μM)		CC <sub>50</sub> (μM)	SI
				<i>L. infantum</i> promastigotes	<i>L. infantum</i> amastigotes	Murine Splenocytes	
1	I		H	6.27 ± 0.70	0.45 ± 0.14	4.41 ± 1.07	9.8
2	I		H	>20	0.81 ± 0.05	2.17 ± 0.27	3.3
3	I		H	3.71 ± 0.45	1.01 ± 0.13	2.53 ± 0.14	2.5
4	I		H	4.99 ± 0.31	0.99 ± 1.17	4.96 ± 0.52	5.0
5	I		H	>20	0.44 ± 0.03	2.31 ± 0.72	5.2
6	I		Cl	3.33 ± 0.17	0.19 ± 0.03	0.70 ± 0.12	3.7
7	II		H	13.34 ± 2.74	1.11 ± 0.08	0.31 ± 0.04	-
8	II		H	5.09 ± 0.82	0.35 ± 0.03	3.72 ± 0.76	10.6
9	II		H	3.03 ± 0.45	0.37 ± 1.06	3.04 ± 1.06	8.0
10	II		H	>20	0.58 ± 0.05	5.56 ± 1.13	9.3
-	CPT	n/a		1.12 ± 0.13	0.03 ± 0.01	0.62 ± 0.01	20.7*
-	AMB	n/a		0.80 ± 0.10	0.30 ± 0.00	>20	> 62 <sup>†</sup>

**Figura 24:** Bioatividade de aromaticinas em promastigotas de *Leishmania infantum* – iRFP e em glóbulos brancos do baço de amastigotas infectados (adaptado de <sup>27</sup>)

## 5.5. Derivados de chalconas

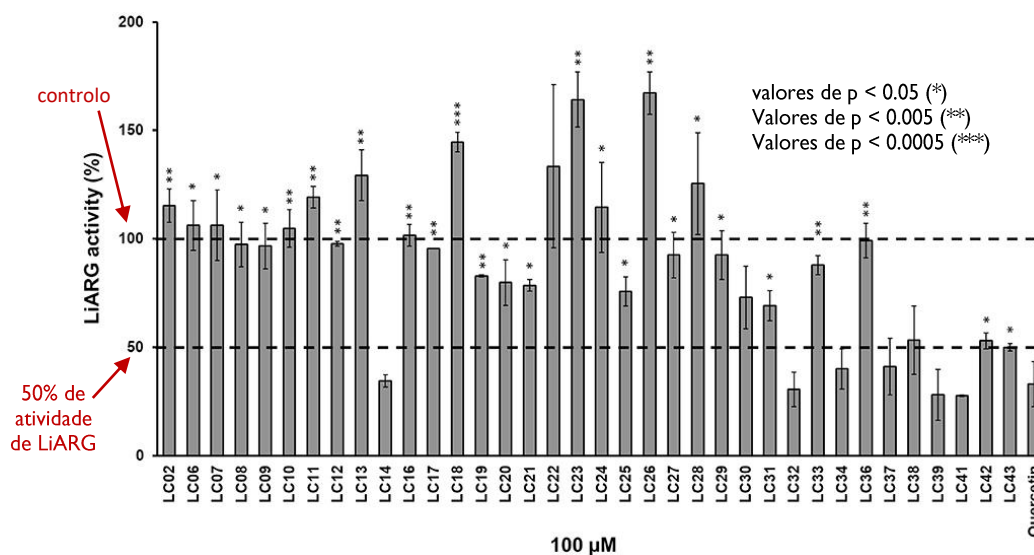
A arginase (ARG), como já foi referida anteriormente, foi uma das enzimas que demonstrou ser diferente no hospedeiro e no parasita. Esta enzima é responsável por catalisar a hidrólise da L-arginina em L-ornitina e ureia, sendo também fundamental na biossíntese de moléculas essenciais ao crescimento e sobrevivência da *Leishmania*, as poliaminas. A inibição da ARG, por sua vez, afeta duas vias importantes do parasita, a via das poliaminas, e a via do tiol, importante para a eliminação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que são geradas pelos macrófagos e pelo estabelecimento da infeção.<sup>28</sup>

As chalconas são compostos intermediários da biossíntese de flavonóides, apresentando propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti tumorais, antioxidantes e anti-inflamatórias. Estruturalmente elas são cetonas aromáticas, constituídas por dois anéis aromáticos ligados por uma ponte carbonil com três carbonos,  $\alpha,\beta$ -insaturada.<sup>28</sup>

Estudos realizados anteriormente já tinham demonstrado que alguns flavonóides eram capazes de inibir algumas espécies de *Leishmania* e por isso, este estudo foi realizado com o intuito de verificar se os derivados das chalconas eram capazes de inibir a arginase de *Leishmania infantum* (LiARG). Para isso foram utilizados 36 derivados sintéticos de chalconas, com diferentes substituições nos anéis.<sup>28</sup>

Neste estudo foi avaliada a capacidade de inibição de cada um dos derivados, o seu efeito anti-*Leishmania* contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. infantum*, a citotoxicidade de cada um dos compostos, a fim de determinar a sua seletividade e ainda a sua biodisponibilidade oral. Por fim, foi avaliada também a capacidade destes derivados modularem a resposta imune do hospedeiro.<sup>28</sup>

Inicialmente foi avaliada a potência de inibição de LiARG pelos derivados de chalconas (Fig. 25), através da capacidade que estes tinham em catalisar a conversão de L-arginina em ureia, na presença de cada um dos 36 derivados, a uma concentração de 100  $\mu$ M. A quercetina foi selecionada como inibidor de controlo positivo, uma vez que é um inibidor da ARG já conhecido. A reação com a quercetina foi realizada na ausência de inibidores.<sup>28~</sup>

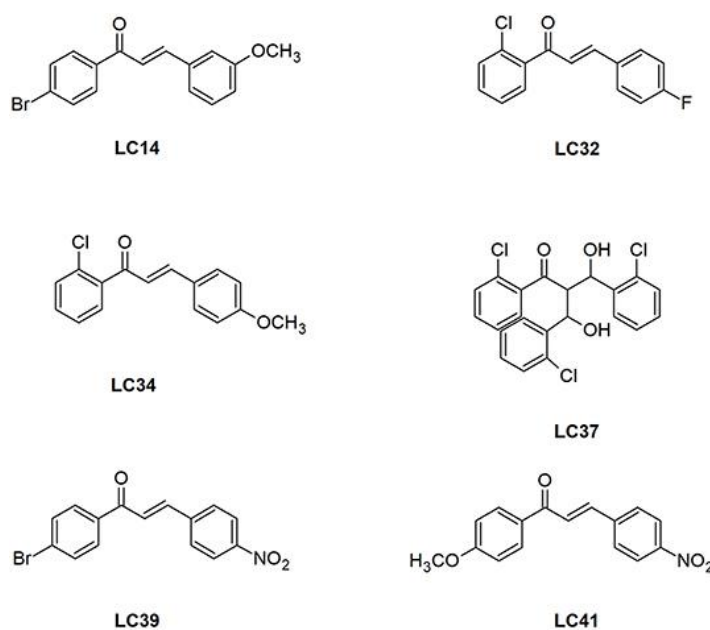


**Figura 25:** Inibição de LiARG por derivados de chalconas. Os resultados são expressos como percentagem da atividade de LiARG (adaptado de <sup>28</sup>)

A atividade de inibição de LiARG dos 36 derivados de chalconas contendo diferentes constituintes nos anéis A e B foi investigada, e os dados obtidos (Fig. 25) indicaram que

cerca de 16 derivados de chalconas demonstraram atividade inibitória contra LiARG. Dentro destes, os compostos LC41, LC39 e LC32, com uma percentagem de inibição de  $72.3\pm 0.3\%$ ,  $71.9\pm 11.6\%$  e  $69.5\pm 7.9\%$  respetivamente, revelaram um potencial inibitório superior ao inibidor de referência (quercetina), com uma percentagem de inibição de  $67.1\pm 10.3\%$ .<sup>28</sup>

Outro dado interessante foi que todos os derivados com grupo nitro na posição 4 do anel B foram capazes de inibir LiAEG, principalmente LC39 e L41. Este grupo nitro no anel B, já fora anteriormente correlacionada com uma forte atividade e seletividade anti-*Leishmania*.<sup>28</sup>

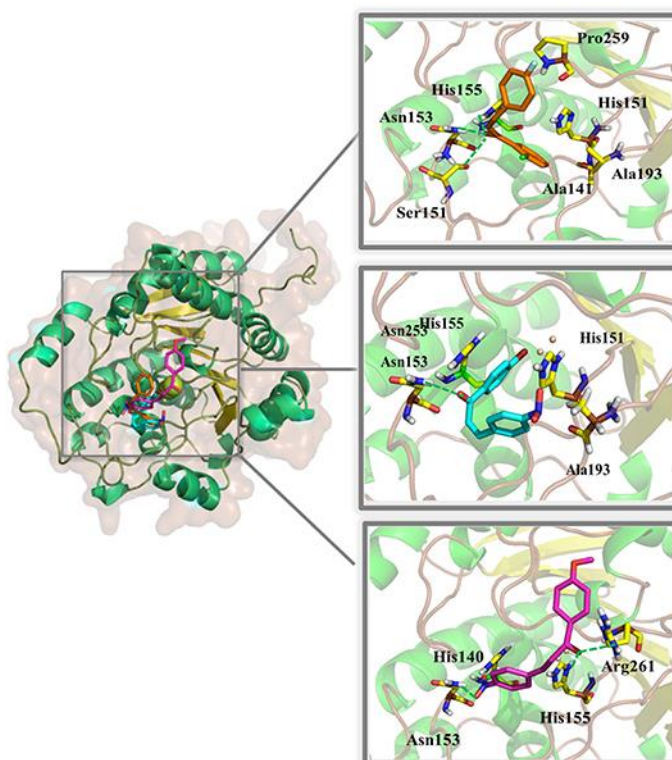


**Figura 26:** Estrutura dos derivados de chalconas que demonstraram inibição de LiARG superior a 50% (adaptado de <sup>28</sup>)

Os derivados mais ativos (Fig. 26), ou seja, que apresentaram maior percentagem de inibição do que a quercetina (LC32, LC39 e LC41) foram sujeitos a estudos comparativos usando técnicas computacionais. Nestes estudos, os derivados eram ligados no sítio ativo da LiARG previamente construída. Verificou-se que todos eles se ligaram à LiARG em pontos de ligação diferentes (Fig.27):<sup>28</sup>

- LC32: a interação com a parte ativa de LiARG ocorreu através de três ligações de hidrogénio entre o átomo de oxigénio do grupo carbonilo e as cadeias laterais polares dos resíduos Ser151, Asn153 e His155. Para além disso, o grupo 2-clorofenil estabeleceu ligações Van der Waals com His140, Ala141, Ser151, Ala193 e Pro259.
- LC39: a ligação de hidrogénio ocorreu entre o seu grupo carbonilo e o átomo de nitrogénio da cadeia lateral Asn153. As interações ocorridas foram principalmente interações Van der Waals e contatos hidrofóbicos com os resíduos His140, His155 e Ala193.

- LC41: foram observadas três ligações de hidrogénio no complexo LC41:LiARG. Duas delas ocorreram entre o grupo carbonilo do composto e o átomo de oxigénio das cadeias laterais de His155 e Arg261, enquanto a terceira ocorreu entre as cadeias do grupo hidroxi-imino- $\lambda$ -I-oxidanil-fenil e o nitrogénio da amida da cadeia lateral Asn153. Também demonstrou interações *Van der Waals* com His140.



**Figura 27:** Ligação dos derivados de chalconas obtidas através de encaixe molecular (adaptado de <sup>28</sup>)

As interações obtidas entre LC32 e Ala141 foram igualmente encontradas no complexo ácido rosmarínico:LiARG obtido por encaixe molecular num estudo realizado por outros investigadores. No entanto, os derivados de chalconas demonstraram maior número de interações *Van der Waals* e ligações hidrofóbicas com LiARG.<sup>28</sup>

Outro dado proveniente de estudos já realizados, foi o de um composto flavonóide que foi considerado o melhor inibidor de LiARG dentro de 5667 flavonóides estudados, e que apresentou interações com os resíduos Ser150 (H), Asp194 (H), Ala192 (A) e Thr257 (A).<sup>28</sup>

Todos estes resultados são indicativos de que a estrutura dos flavonóides poderá ser um ponto importante para o design de moléculas anti-LiARG e, conseqüentemente, para o controlo da doença.<sup>28</sup>

As propriedades farmacocinéticas e toxicológicas são aspetos cruciais no alcance de uma boa biodisponibilidade oral e segurança dos medicamentos. Nesse sentido, os três derivados de chalcona mais ativos (Fig. 26), foram comparados com a miltefosina (único medicamento oral disponível contra a leishmaniose), tendo por base a regra dos cinco de Lipinski. Os resultados obtidos (Fig. 28) demonstraram uma boa biodisponibilidade oral destes compostos.<sup>28</sup>

Foram também realizados estudos relativos aos seus perfis metabólicos, com o intuito de saber se estes atuariam como substratos ou inibidores de nove isoformas do citocromo P450 (CYP450): CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4. Os resultados obtidos (Fig. 28) demonstraram que estes derivados apresentavam potencial inibitório contra CYP1A2 e CYP3A4 e potencial para serem substratos com as isoformas CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4. Esta última isoforma é uma das principais isoformas do CYP450, sendo responsável pelo metabolismo dos xenobióticos. Em geral, a sua inibição pode causar interações medicamentosas.<sup>28</sup>

Do ponto de vista toxicológico, foram realizados testes de hepatotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, toxicidade aguda e cardiotoxicidade. Nos testes de hepatotoxicidade foram utilizados os seguintes biomarcadores enzimáticos: fosfatase alcalina, AST, GGT, LDH e ALT. A toxicidade cardíaca foi avaliada de acordo com a probabilidade dos compostos inibitórios bloquearem os canais de hERG K<sup>+</sup>. Em relação à mutagenicidade foi utilizado o Teste de Ames e a carcinogénese foi analisada in vitro, tendo em conta a capacidade que os derivados de chalconas teriam em desenvolverem tumores em camundongos. Por fim, a capacidade de os derivados produzirem toxicidade aguda teve por base a quantidade necessária para matar 50% dos animais testados, após serem administrados por via oral (mg/kg de peso corporal).<sup>28</sup>

Drug/Chalcones	ADMET predictor							
	Pharmacokinetic properties			Toxicological endpoints				
	CYP inhibition	CYP substrate	Rule of 5	hERG inhibitor	Hepatotoxic	Mutagenic	Carcinogenic	Acute toxicity in rats
LC32	1A2, 2C19 3A4	1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4	Yes	Yes	No	No	No <sup>R,M</sup>	726.79
LC39	1A2, 2C19, 3A4-	1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1. 3A4	Yes	No	No	Yes	No <sup>R,M</sup>	1,568.17
LC41	1A2,3A4	1A2,2A6, 2B6, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4	Yes	No	No	Yes	No <sup>R,M</sup>	2,374.28
Miltefosine	-	-	Yes	No	No	No	No <sup>R,M</sup>	855.10

R: rats; M: mice.

**Figura 28:** Resultados in silico da farmacocinética e propriedades toxicológicas dos derivados de chalconas mais ativos contra LiARG (LC32, LC39 e LC41) e miltefosina (adaptado de <sup>28</sup>)

De acordo com os resultados obtidos (Fig. 28), concluímos que em relação aos parâmetros avaliados, apenas LC32 demonstrou potencial de inibição de hERG K<sup>+</sup>, o que significa que poderá induzir cardiotoxicidade. No entanto, nenhum destes inibidores apresentou riscos de hepatotoxicidade, carcinogenicidade ou de toxicidade aguda. Em geral, os derivados de chalconas com atividade anti-*Leishmania* apresentaram bons perfis farmacocinéticos e baixa toxicidade.<sup>28</sup>

Os derivados de chalconas com inibição de LiARG superior a 50% (LC14, LC32, LC34, LC37, LC39, LC41) foram selecionados para investigação relativamente à sua atividade contra promastigotas de *L. infantum* e o medicamento Fungizone<sup>®</sup>, à base anfotericina B, foi utilizado como medicamento de referência (Fig. 29).<sup>28</sup>

Chalcone	ARGLi inhibition (%) (100 $\mu$ M)	RAW 264.7	Promastigotes	Amastigotes	Selectivity Index	
		CC <sub>50</sub> $\pm$ SE ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> $\pm$ SE ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> $\pm$ SE ( $\mu$ M)	PRO	AMA
LC14	65.4 $\pm$ 2.8	75.1 $\pm$ 8.9	283.4 $\pm$ 14.2	n.d.	<1	n.d
LC32	69.5 $\pm$ 7.9	479.1 $\pm$ 19.5	74.1 $\pm$ 10.9	111.5 $\pm$ 19.8	6.5	4.3
LC34	59.9 $\pm$ 9.2	3,010.9 $\pm$ 88.0	747.2 $\pm$ 22.3	65.4 $\pm$ 10.9	4.0	46.0
LC37	58.9 $\pm$ 9.2	>4,000	>1,500	n.d.	n.d.	n.d
LC39	71.9 $\pm$ 11.6	4531.0 $\pm$ 212.0	398.0 $\pm$ 44.2	42.3 $\pm$ 17.1	11.4	107.1
LC41	72.3 $\pm$ 0.3	1,146.8 $\pm$ 58.8	319.1 $\pm$ 14.3	43.7 $\pm$ 13.7	3.6	26.2
Fungizone <sup>®</sup>	n.d	11.9 $\pm$ 0.2	0.024 $\pm$ 0.0007	0.138 $\pm$ 0.01	503.2	86.9

**Figura 29:** Inibição de LiARG, atividade anti-*L. infantum* e citotoxicidade dos derivados de chalconas (adaptado de <sup>28</sup>)

De acordo com os resultados obtidos (Fig. 29), podemos verificar que todos os derivados demonstraram efeito anti-*Leishmania*, embora com valores de IC<sub>50</sub> superiores à Fungizone<sup>®</sup>, o que significa que é necessário uma maior concentração destes derivados para produzir um efeito inibitório de 50% de LiARG. Comparando apenas os derivados de

chalconas, LC32 foi o que apresentou um melhor efeito contra promastigotas *L. infantum* (IC<sub>50</sub> de 74.1±10.9 µM). LC37 foi o único que não demonstrou atividade *in vitro* contra promastigotas de *L. infantum* com a máxima concentração testada.<sup>28</sup>

A citotoxicidade dos derivados de chalcona selecionados foi avaliada contra os macrófagos RAW 264.7 de forma a avaliar a sua seletividade contra células do parasita. LC39 revelou um CC<sub>50</sub> de 4531.0±212.0 µM e, portanto, um índice de seletividade (SI) de 11.4, o que significa que é cerca de 10 vezes mais seletivo contra promastigotas de *L. infantum*. Já LC14, demonstrou um CC<sub>50</sub> de 75.1±8.9 µM e, portanto, um SI<1, o que significa que é mais tóxico para a célula hospedeira do que para o parasita.<sup>28</sup>

Os derivados de chalcona LC34, LC41 e LC32, apresentaram valores de CC<sub>50</sub> de 3010.9±88.0 µM (SI de 4.0), 1146.8±58.8 µM (SI de 2.6) e 479.1±19.5 µM (SI de 6.5), respetivamente. Por comparação de LC39 e LC41, cuja única diferença estrutural se encontra na posição 4 do anel A, em que LC39 apresenta um brometo e LC41 um grupo metoxilo, podemos dizer que essa substituição apresenta um papel importante na citotoxicidade para macrófagos. LC37 demonstrou não inibir o crescimento dos macrófagos, na maior concentração testada.<sup>28</sup>

Relativamente à análise dos derivados de chalcona contra amastigotas intracelulares de *L. infantum*, apenas foram utilizados LC32, LC34, LC39 e LC41 que foram os que apresentaram atividade contra promastigotas *L. infantum* e uma seletividade contra as células do parasita superior a 1 (SI > 1). Aqui a Fungizone<sup>®</sup> foi novamente utilizada como fármaco de referência. Foram utilizados macrófagos peritoneais infetados com *L. infantum*, e que foram posteriormente tratados com os derivados de chalcona selecionados e a viabilidade de promastigotas recuperados dos macrófagos infetados foram medidas.<sup>28</sup>

Analisando os valores de IC<sub>50</sub> para amastigotas (Fig. 29), verifica-se que todos os derivados de chalcona foram capazes de reduzir a carga parasitária quando comparados às células controlo que não foram tratadas, o que significa que os inibidores de ARG conseguem interagir com o seu alvo em macrófagos infetados. Embora com estes resultados, se consiga evidenciar que os compostos LC32, LC34, LC39 e LC41 dificultam a carga parasitária em macrófagos pela inibição de ARG, são necessárias mais investigações para confirmar a ARG como alvo.<sup>28</sup>

LC39 apresentou valores de IC<sub>50</sub> contra amastigotas intracelulares menores comparativamente aos outros inibidores, resultando num SI superior ao medicamento de referência. Este valor elevado de SI é de grande importância uma vez que a seletividade é uma característica altamente requerida na descoberta de fármacos leishmanicidas, nesse sentido já realizadas, sugeriram que a presença de um grupo nitro no anel B parece

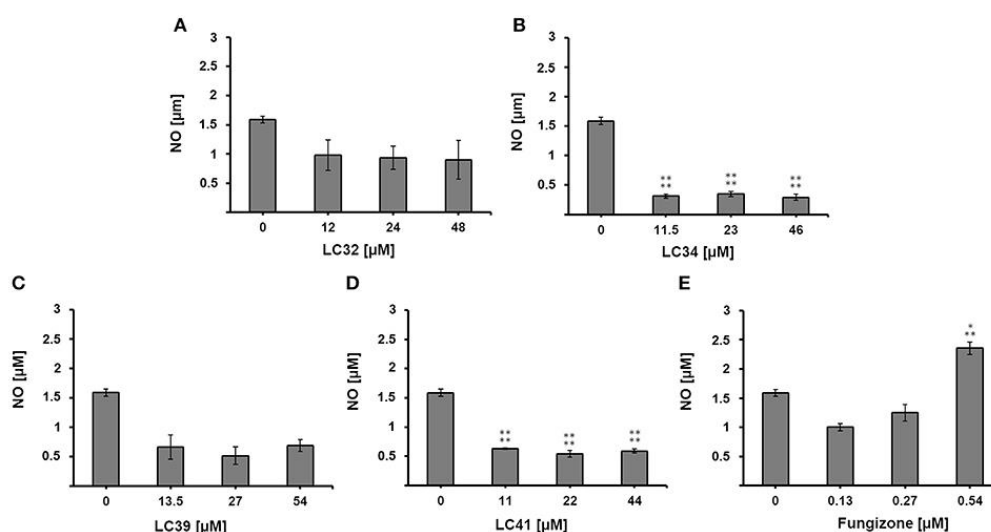
influenciar a atividade anti-*Leishmania* e, de facto, isso pode ser sustentado com estes dados.<sup>28</sup>

Há relatos de que os anéis aromáticos, constituintes principais dos farmacóforos das chalconas, são essenciais para a bioatividade e, de facto, a presença de substituintes nas posições 2' e 3' do anel B parecem aumentar a atividade da chalcona, enquanto que os mesmos substituintes, mas na posição 4, levam a uma diminuição da atividade leishmanicida da molécula. Já a ponte de 3 carbonos  $\alpha,\beta$  insaturada parece não interferir com a atividade anti-*Leishmania* das chalconas. No entanto, LC37 que apresenta substituições na ponte de 3 carbonos, não apresentou nem atividade contra leishmania, nem contra os macrófagos, mesmo às mais elevadas concentrações testadas.<sup>28</sup>

Na tentativa de compreender a atividade antileishmania, foi avaliado se houve aumento da produção de NO por macrófagos infetados com *L. infantum* após tratamento com concentrações crescentes dos derivados LC32, LC34, LC39 e LC41 (Fig. 30).<sup>28</sup>

De acordo com os resultados (Fig. 30), podemos observar uma diminuição da produção de NO pelos macrófagos infetados com *L. infantum* quando tratados com LC32 e LC41, em comparação com o grupo controlo. Pelo contrário, LC34 e LC39 não revelaram diferenças significativas. Estes resultados foram revelantes para mostrar que o efeito anti-*Leishmania* dos derivados de chalconas poderão de facto estar relacionados a uma inibição direta no parasita, por exemplo, pela inibição da ARG, uma vez que segundo os dados obtidos concluímos que estes foram incapazes de modular a resposta imune do hospedeiro.<sup>28</sup>

Em geral, os resultados foram favoráveis relativamente aos efeitos da inibição da ARG pelos derivados de chalcona. Nesse sentido, fármacos à base destes derivados poderão ser bons candidatos a fármacos contra leishmaniose visceral.



**Figura 30:** Efeito dos derivados de chalcona na produção de NO pelos macrófagos infetados com *L. infantum* (adaptado de <sup>28</sup>)



## 6. CONCLUSÃO

A LCan é um problema de saúde pública que afeta animais domésticos como cães e gatos, mas também seres humanos, podendo mesmo ser fatal. Os animais que apresentam esta doença podem ou não ser sintomáticos, sendo que os sintomas e sinais que estes apresentam são muito variáveis e, portanto, o diagnóstico baseado apenas em observações clínicas requer sempre confirmação através de outros métodos mais complexos, tais como: métodos parasitológicos, moleculares e serológicos. A lesão renal é uma das principais consequências da doença devido à deposição de ICC nos rins, causada pela resposta imune do hospedeiro.

Hoje em dia, ainda não existe tratamento para esta patologia e por isso é fundamental atuarmos na sua prevenção. Existem vários métodos preventivos, sendo a vacinação o método mais eficaz, no entanto, a combinação de várias práticas que previnam a picada do vetor contribuem para uma maior proteção dos animais e, naturalmente, do ser humano, uma vez que os animais são o seu principal reservatório.

Alguns dos compostos utilizados na prevenção da infecção, como é o caso dos *sprays*, *spot-on* e coleiras atuam interferindo no SNC do parasita, levando a asfixia e choque do mesmo. Já outros atuam através da inibição do desenvolvimento e maturação dos estádios primários de *Leishmania*, como é o caso do piriproxifeno. No caso das vacinas, as atualmente comercializadas na Europa são vacinas de segunda geração e atuam através da estimulação do sistema imunológico do hospedeiro, sobretudo das células TH1 que por sua vez induzem a atividade dos macrófagos contra *Leishmania*. Por outro lado, pensa-se que o envolvimento de CD8+ esteja também envolvido na resistência à doença.

Para além das vacinas de segunda geração, temos as vacinas de primeira geração com parasitas vivos/mortos e ainda as vacinas de terceira geração, ou vacinas de DNA. Dentro das vacinas com parasitas, temos o exemplo das vacinas vivas atenuadas, uma estratégia que permite desencadear a resposta imunológica do hospedeiro, sem provocar doença no mesmo, como é o caso da candidata vacina atenuada com *L. major* sem o gene p27, gene responsável pela síntese de ATP sendo, portanto, essencial para a sobrevivência e desenvolvimento do parasita.

Os tratamentos atualmente existentes contra LCan não são capazes de eliminar o parasita por completo, apresentam diversas limitações quer na sua elevada toxicidade, custo e dificuldade de administração e cada vez mais surgem resistências por parte dos parasitas em relação aos fármacos anti-*Leishmania*, daí que o estudo e pesquisa de novas moléculas para esta doença, seja cada vez mais uma emergência de saúde pública.

O conhecimento de moléculas do parasita que sejam diferentes ou estejam ausentes nos mamíferos é um bom ponto de partida para a investigação de novos fármacos que sejam seletivos para o parasita, mas que não causem danos no hospedeiro. É o caso da Top1B da *Leishmania* que possui uma estrutura heterodinâmica, contrariamente às restantes espécies de animais que possuem uma Top1B monomérica, ou ainda da arginase que demonstrou também ser diferente no hospedeiro e no parasita.

Outro fator a ter em conta é a estrutura molecular de certos compostos, como é o caso das chalconas, por exemplo, em que foi demonstrado que a presença de substituintes nas posições 2' e 3' do anel B estão relacionados com o aumento da sua atividade. Por outro lado, estudos anteriores já tinham chegado à conclusão de que substituições em C14 estão relacionadas com um aumento da atividade anticancerígena e que a ponte de etilenodioxo entre C2 e C3 em certas substâncias, aumenta a atividade antiparasitária contra *Trypanosoma*. No caso das aromatecinas sabemos que estas conseguem contornar as barreiras de resistência aos CPT e possuem atividade anti-*Leishmania*, no entanto o seu mecanismo ainda não é bem conhecido, pelo que existem outros mecanismos pelos quais as moléculas atuam que ainda têm de ser investigados e estudados.

O conhecimento de mecanismos de resistência dos parasitas, também tem demonstrado cada vez mais interesse para o desenvolvimento de fármacos que os consigam contornar, uma vez que já existem algumas resistências a certos medicamentos utilizados contra *Leishmania*, como é o caso dos compostos de antimónio.

As aromatecinas surgiram com o objetivo de contornar as limitações de resistência aos CPT. Estes mecanismos de resistência aos CPT são sobretudo devido a uma sobreexpressão do transportador ABCG6 e/ou substituição de aminoácidos Gly185Arg e Asp325Glu na grande subunidade da enzima LTop1B.

A combinação de fármacos é também uma estratégia que se utiliza com o objetivo de contornar resistências e tornar o tratamento mais eficaz devido a complementaridade de diferentes mecanismos dos diferentes fármacos. Por outro lado, existem certas combinações de fármacos que apresentam menor toxicidade comparativamente à sua administração isolada.

Não existem fármacos perfeitos, mas existem algumas características fundamentais para que estes venham a ser comercializados como tratamento da LCan. A boa seletividade da molécula, boa biodisponibilidade oral, segurança, capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro sem causar danos neste e ainda uma molécula que seja capaz de contornar os mecanismos de resistência dos parasitas, são fatores de extrema importância e que devem ser tidos em conta aquando da investigação de novas moléculas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TOEPP, Angela J.; PETERSEN, Christine A. – The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Veterinary Science*, 130, (2020) 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.02.004>
2. CHAUHAN, Indira Singh et al. – Evolutionary comparison of prenylation pathway in kinetoplastid *Leishmania* and its sister *Leptomonas*. *BMC Evolutionary Biology*. 15(261), (2015) 1-19. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0538-3>
3. SOLANO-GALLEGO, L. et al. – Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 165(1-2), (2019) 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>
4. DE CARVALHO, Amanda Gabriela, et al. – Impact of socioeconomic status on the knowledge, attitudes, and practices about visceral leishmaniasis among dog owners. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 15(10), (2021) 1523-1531. <https://doi.org/10.3855/jidc.14522>
5. DOSTÁLOVÁ, Anna; VOLF, Petr. – *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *BMC Journal*. 5(276), (2012) 1-12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>
6. KOUTINAS, Alek F. et al. – Guidelines da Leishmaniose Canina. *LeishVet*. <https://www.leishvet.org/fact-sheet/>
7. REGUERA, Rosa M; MORÁN, Miguel; PÉREZ-PERTEJO, Yolanda; GARCÍA-ESTRADA, Carlos; BALAÑA-FOUCE, Rafael. – Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 227, (2016) 98-114. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.011>
8. ALVES, Graziella Borges, et al. – Efficacy of imidacloprid/flumethrin collar in preventing canine leishmaniosis in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*. (2022). <https://doi.org/10.1111/tbed.14571>
9. GWALTNEY-BRANT, Sharon M. – Atypical Topical Spot-on Products. *Small Animal Toxicology*. 70(3), (2013) 741-754. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0717-1.00070-3>
10. PAGE, Stephen W. – Antiparasitic drugs. *Small Animal Clinical Pharmacology*. 10(2), (2008) 198-260. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2858-8.X5001-5>
11. CASTANHEIRA, Ana Rita Ferreira (2013). A Farmacoeconomia aplicada à medicina veterinária: análise de custos comparada entre o tratamento e a vacinação da

- leishmaniose canina. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa, Lisboa. 110pp.
12. MORENO, Javier et al. – Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. *PLOS neglected tropical diseases journal*. 6(6), (2012) 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001683>
  13. European Medicines Agency (2016). CaniLeish: Leishmania infantum excreted secreted proteins. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/canileish>
  14. European Medicines Agency (2022). Letifend: Canine leishmaniasis vaccine (recombinant protein). <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/letifend>
  15. CACHEIRO-LLAGUNO, Cristina et al. – Vaccination with Letifend® reduces circulating immune complexes in dogs experimentally infected with L. infantum. *Vaccine*. 38(4), (2020) 890-896. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.078>
  16. ELIKAE, Samira – Development of a new live attenuated Leishmania major p27 gene knockout: Safety and immunogenicity evaluation in BALB/c mice. *Cellular Immunology*. 332, (2018) 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.002>
  17. SOLANO-GALLEGO, Laia. - LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 4(86), (2011) 1-16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
  18. SOARES, R.O.A., LEON, L. (2014). Modelos de Estudo para o Desenvolvimento de Drogas Anti-Leishmania. FIOCRUZ. Rio de Janeiro. <https://books.scielo.org/id/dgkx2/pdf/conceicao-9788575415689-24.pdf>
  19. InterBIAL (2004). Resumo das Características do medicamento: Uriprim. <https://www.bial.com/media/3275/rcm-uriprim-100.pdf>
  20. MARR, J. J., BERENS, R. L., NELSON, D. J. – Antitrypanosomal Effect of alopurinol: conversion in vivo to aminopyrazolopyrimidine nucleotides by Trypanosoma cruzi. *Science*. 201(4360), (1978) 1018-1020. [10.1126/science.356267](https://doi.org/10.1126/science.356267)
  21. MOREIRA, Vanessa Ribeiro et al. – Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by Leishmania infantum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 61(6), (2017). <https://doi.org/10.1128/AAC.02360-16>
  22. BANETH, Gad; SHAW, Susan E. – Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Veterinary parasitology*. 106(4), (2002) 315-324. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00115-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00115-2)

23. VIRBAC (2018). Resumo das Características do Medicamento: Milteforan. <https://pt.virbac.com/medicamentos-sujeitos-a-receita/milteforan.html>
24. NOGUEIRA, Fábio dos Santos et al. – Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & vectors*. 12(79), (2019) 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3323-0>
25. VOULDOUKIS, Ioannis, et al. – Canine Visceral leishmaniasis: comparasion of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Veterinary parasitology*. 135(2), (2006) 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.09.003>
26. SIMÃO, Joana Sofia Correia, (2018). Tratamento e prevenção da leishmaniose em cães domésticos (*Canis familiaris*): Avaliação de diferentes cenários. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, Lisboa, 82pp.
27. REGUERA, Rosa M. et al. – Antiparasitic Effect of synthetic aromathecins on *Leishmania infantum*. *BMC Veterinary*. 15(405), (2019) 1-8 <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2153-9>
28. GARCIA, Andreza R. - Identification of Chalcone Derivates as Inhibitors of *Leishmania infantum* Arginase and Promising Antileishmanial Agents. *Frontiers in Chemistry*. 8, (2021) 1-10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.624678>
29. DURO, P. N. (2013). Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para quantificação de pesticidas neonicotinóides em amostras de água contaminadas. Dissertação de Mestrado em Análises Químicas Ambientais. Departamento de Química, Universidade de Évora. Évora. 78pp. <http://hdl.handle.net/10174/9019>