



**UFBA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA



**FIOCRUZ**

**TESE DE DOUTORADO**

**ASPECTOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: EPIDEMIOLOGIA,  
SOROLOGIA E NOVAS PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO**

**LUCILENE AMORIM SILVA**

**Salvador –Bahia-Brasil**

**2011**



**UFBA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA



**FIOCRUZ**

**TESE DE DOUTORADO**

**ASPECTOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: EPIDEMIOLOGIA,  
SOROLOGIA E NOVAS PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO**

**LUCILENE AMORIM SILVA**

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia/ Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Patologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Aldina Maria Prado Barral

Salvador

2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Silva, Lucilene Amorim  
S685a Aspectos da leishmaniose visceral canina: epidemiologia, sorologia e novas  
perspectivas de tratamento [manuscrito] / Lucilene Amorim Silva . - 2011.  
116 f.; 30 cm

Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Laboratório  
Integrado de Microbiologia e Imunoregulação, LIP. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.  
Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2011.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Aldina Maria Prado Barral.

1. Leishmaniose visceral canina 2. *Leishmania chagasi* 3. Óxido nítrico. 4. Superóxido  
Dismutase 5. Alopurinol 6. Haloacetamido I.Título.

CDU 616.993.161

Título da Tese: "ASPECTOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: EPIDEMIOLOGIA, SOROLOGIA E NOVAS PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO."

Candidata: LUCILENE AMORIM SILVA

Orientadora: Dra. Aldina Maria Prado Barral

Comissão Examinadora:

Dra. Ivete Lopes de Mendonça	1º Examinador
Dra. Ana Lúcia Abreu Silva	2º Examinador
Dr. Luis Fernando Pita Gondim	3º Examinador
Dr. Washington Luis Conrado dos Santos	4º Examinador
Dra. Aldina Maria Prado Barral	5º Examinador

#### PARECER

A Comissão Examinadora é:

Favorável à divulgação da tese em sua forma atual<sup>1</sup>.

Favorável à divulgação da tese após as modificações sugeridas pela Comissão e a aprovação do orientador<sup>2</sup>.

Favorável à divulgação da tese após as modificações sugeridas e aprovadas pela Comissão<sup>3</sup>.

Salvador, 19 de outubro de 2011.

  
Dra. Ivete Lopes de Mendonça

  
Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

  
Dr. Luis Fernando Pita Gondim

  
Dr. Washington Luis Conrado dos Santos

  
Dra. Aldina Maria Prado Barral

## **Dedicatória**

*Aos meus pais Silva e Luiza, que sonharam meus sonhos antes de mim e fizeram o possível para realizá-los. Todas as minhas conquistas são sempre para eles e por eles.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus meu amor maior, que nunca me dá provas que eu não possa suportar e não me abandona em nenhum momento. “Ele” é a perfeição da minha vida.

Aos meus pais Silva e Luiza e minhas irmãs Luciane e Luciléia. Jamais poderei expressar em palavras o imenso amor que sinto por essa família, esse amor é o que me leva a todos os lugares e me faz viver.

Aos colegas e professores do LIMI e LIP, pela colaboração neste trabalho e por me receberem de braços abertos em seu grupo. Em especial a Rayssa, Kiyoshi e Dirceu, admiro muito pessoas que tem a humildade de ensinar e a nobreza de aprender com os outros.

Aos professores da Pós- Graduação em Patologia, por contribuírem com minha formação.

Aos amigos do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Marquinhos, Fábio, Sírio, Magda e Manuela, que tornaram minha estadia na Bahia sempre divertida e aconchegante.

As secretárias do LIMI e LIP , Elze e Andrezza por serem prestativas e sempre me atenderem com muito carinho, obrigada por toda ajuda e atenção.

A senhora Lia que me recebe com um grande abraço e boas vindas todas as vezes que venho a este Centro.

A Profa. Dra. Aldina Barral, sou muito grata por ter me recebido sempre tão bem em seu laboratório e ter confiado no meu trabalho desde o primeiro momento que começamos essa parceria. Muito obrigada pela oportunidade que me deu, aos preciosos conselhos e ensinamentos.

A minha AMADA família do laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão, sem vocês eu nada seria, são dez anos de trabalho que me ensinaram o valor da

minha profissão e acima de tudo, ganhei os mais valiosos amigos – irmãos, que uma pessoa poderia desejar. Gostaria de citar todos vocês aqui, mas infelizmente não posso, então sintam-se todos representados nos nomes de: Graciomar Costa (meu querido amigo e parceiro de pesquisa), Ana Paula Azevedo, Márcia Maciel, Flávia Amaral, Luzia Melo, Anne Karine Martins, Thiare Fortes, Jollen Lopes, Dona Joana, Mayara Cristina, Luecya Alves, Aramys Reis, Jeamille Bezerra, Conceição Pedrosa, Fernando Patrício, Rafael Jacob e João Freitas. “Uma vez Lifiano sempre Lifiano”

A Eder Fialho pelo eterno carinho e paciência, como você mesmo diz nossa amizade nos faz crescer e nos edifica.

A Profa.Dra. Rosane Guerra, minha “vó científica”, um dos meus maiores exemplos de competência e honestidade. O Lif nasceu do sonho desta pesquisadora.

A minha querida amiga, ex-orientadora e colega de trabalho, Profa. Dra. Flávia Nascimento, serei eternamente grata por ter você em minha vida, tenho um grande exemplo de orientadora, de pesquisadora, de professora e de amiga. Minhas conquistas sempre serão suas e dedicadas a você também.

Aos colegas de trabalho do CCAA-UFMA, ter sido aluna desta Universidade e hoje ser professora dela, me faz perceber que nunca é demais se dedicar ao que ama fazer.

Aos órgãos de fomento: CNPq, FAPEMA e CAPES

Aos veterinários Daniel Cardoso, Fernando Almeida e a Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu da Universidade Estadual do Maranhão, por toda ajuda na realização desta pesquisa.

Ao veterinário e “anjo da guarda” Vicente Ferrer, sua participação nesta tese foi essencial em todas as etapas, muito obrigada por estar sempre disponível para me ajudar com os cães e me socorrer nos momentos difíceis.

## RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica grave, causada pelo protozoário *Leishmania chagasi*. Os mecanismos envolvidos na susceptibilidade e resistência dos cães a esta infecção são controversos. Neste trabalho, os aspectos epidemiológico, imunológico e terapêutico da LVC foram estudados. Inicialmente foi realizado um estudo epidemiológico na Raposa, município de alta endemicidade para LVC, localizado na ilha de São Luís, Maranhão. A triagem dos animais soropositivos para *Leishmania* foi feita por ELISA e os cães soropositivos foram clinicamente avaliados. Os animais foram classificados em assintomáticos e sintomáticos de acordo com os sinais clínicos, sendo avaliado seu perfil epidemiológico, incluindo sexo, convivência com outros animais, tipo de alimentação e idade. A sorologia para IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* foi feita por ELISA e foi testada a presença de correlação entre as subclasses e os sinais clínicos. Em seguida, foi investigada a produção de óxido nítrico (NO), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) no soro e sobrenadante de cultura do linfonodo e baço. Na segunda fase da pesquisa, foram utilizados cães da raça Beagle. Após confirmação da infecção por *Leishmania chagasi* por PCR, os cães foram divididos em dois grupos (n=10/grupo) e foram tratados durante 90 dias, por via oral, diariamente, com Aluporinol (droga de referência) ou com um composto químico promissor, Haloacetamido (droga teste). A cada 30 dias, foi realizada avaliação clínica e bioquímica sérica. Foram quantificadas também as concentrações séricas de IL-10, IFN- $\gamma$  e Superóxido dismutase (SOD). A carga parasitária foi monitorada nos linfonodos por PCR em tempo real e na pele por imunohistoquímica. O acompanhamento dos animais foi continuado até 90 dias após o final do tratamento. Os resultados obtidos demonstraram que a soroprevalência foi de 29,6%. Do total de cães infectados, a maioria eram machos, jovens, conviviam com outros animais e se alimentavam de comida caseira. Em relação aos sinais clínicos, 37% eram assintomáticos e 63% eram sintomáticos. Os cães sintomáticos apresentaram aumento de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, de NO e de IFN- $\gamma$ , entretanto, apresentaram uma diminuição na produção de TNF- $\alpha$ . Houve correlação positiva entre os níveis de IgG2 e o número de sinais clínicos. O tratamento com Haloacetamido reduziu significativamente a carga parasitária, tanto nos linfonodos quanto na pele, e aumentou a produção de SOD no último mês de tratamento, mas induziu uma piora no quadro clínico, sem alterações séricas hepáticas e renais, quando comparado ao tratamento com Alopurinol. Entretanto, noventa dias após a

suspensão dos fármacos, não houve diferenças entre os grupos nos parâmetros avaliados, com exceção das citocinas que foram aumentadas nos animais tratados com Haloacetamido. Dessa forma, demonstramos que: o NO, associado ao aumento de IFN $\gamma$ , pode induzir diminuição nas concentrações de TNF- $\alpha$  e concomitante imunossupressão nos cães; que a produção aumentada de IgG2 parece estar relacionada ao quadro mais grave da infecção; e que embora sejam necessários estudos complementares para comprovar a sua eficácia a longo prazo, o tratamento com o Haloacetamido, pode reduzir a carga parasitária de animais infectados, aumentando a produção de SOD e regulando a secreção de citocinas.

**Palavras – chave:** Leishmaniose visceral canina, *Leishmania chagasi*, óxido nítrico, Superóxido Dismutase, Alopurinol, Haloacetamido

## ABSTRACT

The canine visceral leishmaniasis (CVL) is a systemic disease caused by *Leishmania chagasi* protozoan. The mechanisms involved in susceptibility or resistance of dogs to this infectious disease are controversy. In this work, the epidemiologic, immunological and therapeutic aspects of CVL were evaluated. Initially it was done an epidemiologic study in Raposa municipality situated at Sao Luis island, Maranhão state, and highly endemic to CVL. The trial of serum positive dogs to *Leishmania* was done by ELISA and the serum positive dogs were clinically evaluated. The dogs were classified in asymptomatic and symptomatic according to the clinical status, and their epidemiologic aspects, including sex, presence of other animals, kind of food, and age were observed. The correlation among anti-*Leishmania* IgG1 and IgG2 isotypes and the clinical signs was evaluated. Then, the production of nitric oxide (NO), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in the serum and supernatant of lymph node and spleen cultures was evaluated. In the second phase, dogs from the Beagle strain was used. After confirmation of *Leishmania chagasi* infection by PCR, the dogs were shared in two groups (n=10/group) and were daily treated by oral route, with aluporinol (reference drug) or a new and promissory chemical compound, haloacetamid (test drug). The treatment was maintained by 90 days. Each 30 days, the dogs were clinically and biochemically evaluated. The serum levels of IL-10, IFN- $\gamma$  and Superoxide dismutase (SOD) were evaluated. The parasite burden was followed at lymph nodes and skin by real time PCR and imunohistochemistry, respectively. The dogs were followed until 90 days after the end of treatment. The results showed a prevalence of 29.6% to *Leishmania* infection. The majority of infected dogs was male, young, lived with other animals and was fed with house food. The clinical evaluation shown that 37% of the dogs were asymptomatic and 63% were symptomatic. The symptomatic dogs shown increase of anti-*Leishmania* IgG antibody, NO and IFN- $\gamma$ . However, they shown decrease of TNF- $\alpha$  production. There was a positive correlation only between the IgG2 levels and the clinical signs number. The treatment with haloacetamid reduced the parasite burden in the lymph nodes and in the skin and increased the SOD production however the dogs became worst at the third month of treatment, even so they did not show alterations in the liver and kidney biochemical profile when compared to the Alopurinol group. Nevertheless, ninety days after the suspension of the treatments, there was no difference between the groups at all the evaluated parameters, with exception of cytokine which was increased in the Haloacetamid group. Hence, we shown here that: the NO

associated to the IFN $\gamma$  increase can induce a decrease of TNF- $\alpha$  and an immunosuppressive status in the dogs; the increased production of IgG2 seems to be related to the infection progression; and finally, however more studies are necessary to verify the long term efficacy of the haloacetamid, the treatment by three months with this product can reduce the parasite burden from infected dogs by increasing the SOD production and regulating the cytokines secretion.

**Keywords:** Canine visceral leishmaniasis, *Leishmania chagasi* , nitric oxide, Superoxide Dismutase, Alopurinol, Haloacetamide.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1- Distribuição de outras espécies de <i>Lutzomya</i> no Brasil.	22
Figura 2- Principais sinais clínicos em cães infectados por <i>Leishmania chagasi</i> .	28
Figura 3- Reação de de dismutação do ânion superóxido que dá origem ao peróxido de hidrogênio.	33
Figura 4- Áreas selecionadas baseadas na notificação de casos de LVA de 1997 a 2005.	36
Figura 5- Sinais clínicos mais frequentes em cães soropositivos para <i>Leishmania chagasi</i> .	43
Figura 6- Títulos séricos de anticorpos IgG anti- <i>Leishmania</i> em cães assintomáticos e sintomáticos	44
Figura 7- Títulos séricos de anticorpos IgG1 em cães assintomáticos e sintomáticos.	45
Figura 8- Títulos séricos de anticorpos IgG2 em cães assintomáticos e sintomáticos.	46
Figura 9- Correlação entre IgG , IgG1 e IgG2 e gravidade dos sinais clínicos	48
Figura 10- Produção de óxido nítrico no soro de cães com sorologia negativa, assintomáticos e sintomáticos .	49
Figura 11- Concentrações de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ (a,b) no soro de cães com sorologia negativa (Controle), assintomáticos e sintomáticos.	50
Figura 12- Concentrações de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ (a,b) nos sobrenadantes de culturas de baço de cães com sorologia negativa	51
Figura 13- Concentrações de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ (a,b) no sobrenadante de linfonodos de cães com sorologia negativa, assintomáticos e sintomáticos.	52

## CAPÍTULO II

Figura 1- Esquema estrutural das principais drogas utilizadas para tratamento das leishmanioses.	79
Figura 2- Estrutura de MF56, MF708, MF29, MF191 e MF569	82
Figura 3- Mapa da Ilha de São Luís-MA, com a localização do São Raimundo, região pertencente ao Distrito Tirirical.	85
Figura 4- Sinais clínicos em animais infectados por <i>L.chagasi</i> .	86
Figura 5- Obtenção de amostras de sangue em animais infectados por <i>L.chagasi</i> .	88
Figura 6- Escores clínicos dos cães infectados por <i>Leishmania chagasi</i> .	93
Figura 7- Ultrassonografia abdominal de cães infectados por <i>Leishmania chagasi</i> .	94
Figura 8- Quantificação da carga parasitária de cães infectados por <i>Leishmania chagasi</i> .	95
Figura 9- Número de macrófagos infectados por <i>Leishmania chagasi</i>	96
Figura 10- Quantificação de citocinas em cães infectados por <i>Leishmania chagasi</i> .	98
Figura 11- Produção de Superóxido Dismutase em cães infectados por <i>Leishmania chagasi</i> .	99

## LISTA DE TABELAS

### *CAPÍTULO I*

Tabela 1 Distribuição dos cães com sorologia negativa e positiva para *Leishmania chagasi* por faixa etária 42

### *CAPÍTULO II*

Tabela 1 Suscetibilidade ( $IC_{50}=\mu M$ ) de espécies de *Leishmania* aos derivados de ácido 3-haloacetamidobenzoico 83

Tabela 2 Avaliação de parâmetros bioquímicos em cães infectados por *L. chagasi* (média $\pm$ SE). 92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- análise de variância  
CR3- receptor de complemento  
CD 4<sup>+</sup>- Co-receptor de linfócito T auxiliar  
CD 8<sup>+</sup>- Co-receptor de linfócito T citolítico  
DNA- Ácido desoxirribonucléico  
DTH- delayed type hypersensitivity  
ELISA- Ensaio Imunoenzimático  
Foxp3- forkhead box P3  
gp63- glicoproteína 63  
IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IC<sub>50</sub>- inhibitory concentration  
Ig – imunoglobulina  
IFI-Imunofluorescência Indireta  
IL- Interleucina  
INF- $\gamma$ - Interferon gama  
iNOS – inducible nitric oxide synthase  
LPG-Lipofosfoglicano  
LT-Leishmaniose Tegumentar  
LVA- Leishmaniose Visceral Americana  
LVC- Leishmaniose Visceral Canina  
MAPA-Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
MAP2- proteínas associadas a microtubulos  
MHC- Complexo principal de histocompatibilidade  
mRNA- Ácido Ribonucléico mensageiro  
MS- Ministério da Saúde  
NO – óxido nítrico  
OMS- Organização Mundial da Saúde  
PBS- Phosphate buffer saline  
PCR - Polymerase Chain Reaction  
PGE<sub>2</sub>- Prostaglandina E2  
RT-PCR- pcr Transcriptase reversa  
RNA- Ácido Ribonucléico

RPMI- Roswell Park Memorial Institute medium

rpm- rotações por minuto

SBF- Soro Bovino Fetal

SGS - Sonicado de glândula salivar

SOD-Superóxido Dismutase

TRL- Receptores Toll-like

TGF- $\beta$ - Fator de crescimento tumoral beta

Th- Linfócito T auxiliar

Th1- “T helper 1”

Th2- “T helper 2”

TNF- $\alpha$ - Fator de necrose tumoral alfa

mL-mililitro

N-normal

ng-nanograma

nM-nanomolar

pg-picograma

$\mu$ g-micrograma

$\mu$ L-microlitro

g-grama

## INDÍCE

<b>Resumo</b>	7
<b>Abstract</b>	9
Lista de figuras	11
Lista de tabelas	13
Lista de abreviaturas e siglas	14
<i>CAPÍTULO I</i>	
<b>I. Introdução</b>	
1.1 <i>Leishmania</i>	21
1.2 Leishmaniose Visceral Canina	23
1.3 Aspectos clínicos da LVC	25
1.4 Aspectos laboratoriais da LVC	28
1.5 Aspectos Imunológicos da LVC	31
<b>II. Justificativa</b>	34
<b>III. Objetivos</b>	
3.1 Gerais	35
3.2 Específicos	35
<b>IV. Materiais e Métodos</b>	
4.1 Área de estudo	36
4.2 Cães e desenho do estudo	37
4.3 Aplicação de questionários	37
4.4 Avaliação clínica	37
4.5 Quantificação de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 <i>anti-Leishmania</i>	38
4.6 Dosagem de nitrato no soro	39

4.7 Cultura de células de baço e de linfonodo poplíteo	39
4.8 ELISA para detecção de citocinas	40
<b>V. Análise estatística</b>	40
<b>VI. Resultados</b>	
6.1 Distribuição de cães soropositivos para <i>Leishmania chagasi</i> na localidade de Vila Nova, município de Raposa no estado do Maranhão.	41
6.2 Quantificação de anticorpos IgG <i>anti-Leishmania</i>	44
6.3 Quantificação de anticorpos IgG1	45
6.4 Quantificação de anticorpos IgG2	46
6.5 Correlação entre escores clínicos e produção de IgG, IgG1 e IgG2	47
6.6 Quantificação de óxido nítrico	49
6.7 Quantificação das citocinas IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$	50
<b>VII. Discussão</b>	53
<b>VIII. Conclusões</b>	60
<b>Referências Bibliográficas</b>	61
<b>Apêndices</b>	115

## *CAPÍTULO II*

### **I. Introdução**

1.1 Tratamentos para Leishmaniose Visceral Canina	78
---	----

<b>II. Justificativa</b>	81
--------------------------	----

### **III. Objetivos**

3.1 Gerais	84
------------	----

3.2 Específicos	84
-----------------	----

### **IV. Materiais e Métodos**

4.1 Animais	85
-------------	----

4.2 Amostras	87
--------------	----

4.3 Extração de DNA das amostras	88
----------------------------------	----

4.4 Seleção dos primers e realização do real-time PCR	89
---	----

4.5 ELISA para detecção de citocinas	89
--------------------------------------	----

4.6 Imunohistoquímica	89
-----------------------	----

4.7 Ultrassonografia	90
----------------------	----

4.8 Superóxido Dismutase	90
--------------------------	----

<b>V. Análise estatística</b>	91
-------------------------------	----

### **VI. Resultados**

6.1 Parâmetros Bioquímicos	92
----------------------------	----

6.2 Avaliação clínica	93
-----------------------	----

6.3 Ultrassonografia	94
----------------------	----

6.4 Carga parasitária	95
-----------------------	----

6.5 Imunohistoquímica	96
-----------------------	----

6.6 Determinação de citocinas no soro	97
---------------------------------------	----

6.7 Produção de Superóxido Dismutase	99
--------------------------------------	----

<b>VII. Discussão</b>	100
<b>VIII. Conclusões</b>	106
<b>Referências Bibliográficas</b>	107

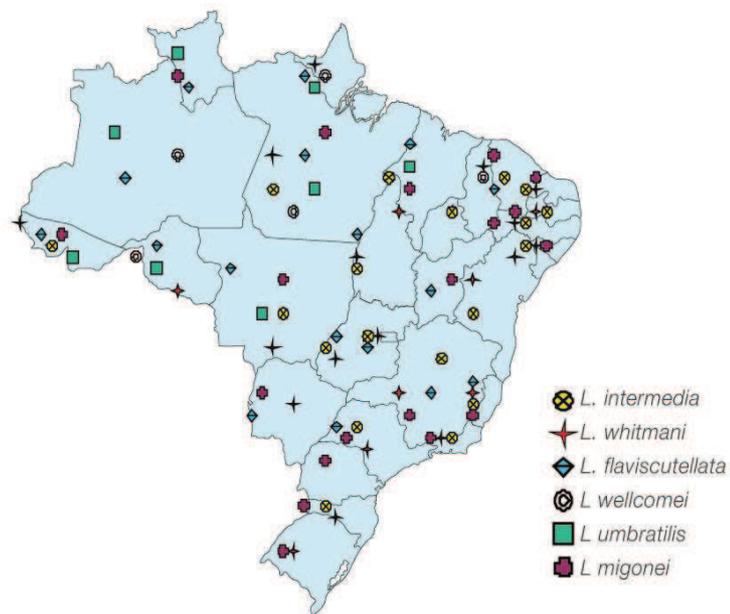
## *CAPÍTULO I*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Leishmania*

As leishmanioses são antroponoses reemergentes causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. São descritas 21 espécies, dentre as quais 30 são reconhecidamente capazes de causar patologias no homem (Herwaldt., 1999; Ashford., 2000). Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, a infecção pode causar sintomatologia diferenciada, indo desde a forma cutânea até a forma mais grave, a visceral (Scott et al., 2004). A leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar, causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* [syn. *Leishmania (Leishmania) chagasi*], é endêmica em cerca de 88 países da Europa e América Latina (Alvar 2004). No Brasil ocorre em todo o território, tanto a Leishmaniose Visceral como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), as quais são endêmicas nas regiões Norte e Nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações, predominando principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (Rath et al., 2003; MS, 2006a).

Esses parasitos apresentam ciclo de vida denominado digenético (heteroxênico), acometendo hospedeiros vertebrados, na forma amastigota e insetos vetores - ordem Díptera, família *Psychodidae* da subfamília *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo e *Phlebotomus* – no Velho Mundo, na forma promastigota (Lainson et al., 1987; Killick-Kendrick, 1990). No Brasil, o principal vetor da leishmaniose visceral é *Lutzomyia longipalpis* popularmente conhecido como mosquito palha ou birigui (Lainson et al., 2005). Já foi demonstrado que a própria saliva destes insetos *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia longipalpis* podem inclusive influenciar na severidade da infecção de acordo com a espécie de *Leishmania* (Hall et al., 1995; Kamhawi et al., 2000).



**Figura 1. Distribuição de outras espécies de *Lutzomya* no Brasil.** Fonte: SVS/MS

Durante a transmissão, as formas promastigotas presentes no trato digestivo do inseto vetor apresentam em sua superfície moléculas de lipofosfoglicanos (LPG), cuja expressão varia de acordo com sua maturidade, sendo portanto diferente nas formas procíclicas e metacíclicas (Awasthi et al., 2004; Sacks et al., 2001). Essa elevada disponibilidade de LPG e de outros glicoconjugados, como a metaloprotease (gp63) e proteofosfoglicanos na superfície do parasito, é responsável por sua proteção da ação das enzimas hidrolíticas presentes no intestino do flebotomíneo, da ação do sistema complemento e atuando como ligante de adesão ao macrófago (Killick-Kendrick, 1990; Alexander et al., 1999; Naderer et al., 2004).

Após o repasto sanguíneo das fêmeas do flebotomíneo e o inóculo do parasito no hospedeiro mamífero, o flagelado do gênero *Leishmania* reside nas células do sistema mononuclear fagocítico como monócitos, macrófagos e células dendríticas (Koutinas et al., 1993; Pinelli et al., 2000). O mecanismo pelo qual esse parasito consegue inativar a resposta das células fagocíticas ainda não está elucidado, porém alguns estudos sugerem que os receptores FcIg e CR3 podem estar envolvidos nesse processo, contribuindo para fagocitose da *Leishmania*. Já se sabe que o LPG não tem um papel importante para as formas

amastigotas do parasito, embora gp63 esteja envolvida diretamente com o estabelecimento e sobrevivência do mesmo nas células. Esse mecanismo inclui degradação de imunoglobulinas, fatores do complemento e proteínas lisossomais (Handman., 1999; Chaudhuri et al.,1988).

Yao et al (2003), sugere que a interação com esses receptores CR3 pode ser necessária para inibir a produção de reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio pelos macrófagos.

Vários outros mecanismos são sugeridos para explicar a capacidade desse protozoário de inibir as respostas microbidas das células fagocíticas, em especial dos macrófagos. Isso inclui a interação do parasito com receptores como Toll- like componentes da imunidade inata, participantes de uma resposta inespecífica a alguns patógenos (Awasthi et al.,2004). Embora já tenha sido descrito o LPG não é capaz de ativar TLR4 que pode estar envolvido no desenrolar da infecção através da regulação de iNOS (Debus et al., 2003).

O fato é que após esse processo complexo de internalização do parasito seja por interação via CR3, CR1, Toll-like ou NOD (estudado por participar dos mecanismos de defesa a patógenos intracelulares) o tipo e tamanho de vacúolo formado em seguida, varia de acordo com a espécie de *Leishmania* e o estabelecimento ou não da infecção vai depender de diversos outros fatores em especial imunogenéticos.

## 1.2. Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Existe uma grande dúvida a respeito da leishmaniose visceral no Novo Mundo – se ela foi introduzida, na época da colonização européia e causada pela espécie *L. infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *Leishmania chagasi*. Aplicação de técnicas bioquímicas e de biologia molecular afirmam que são uma única espécie e aceitam a hipótese da mesma ser originada nas Américas.

Os hospedeiros vertebrados na LV, são animais selvagens, como roedores, tatus, raposas e preguiças, animais domésticos, a exemplo de cães, gatos e o próprio homem. No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) é considerado o principal

reservatório do parasito, tendo assim um papel chave no ciclo hospedeiro/reservatório/vetor (Ashford, 2000; Courtenay, 2002, Chamizo, 2005).

A leishmaniose visceral canina (LVC) tem sido descrita como uma das doenças emergentes de maior prevalência nos países da América Latina. Os procedimentos profiláticos recomendados pela Organização Mundial de Saúde para o controle dessa doença, incluem o tratamento sistemático dos casos humanos, o controle vetorial e a eliminação dos reservatórios domésticos, uma vez que até hoje não há cura definitiva para os cães (Tesh, 1995; MS, 2006). Ambas as leishmanioses, visceral canina e visceral humana compartilham muitas características e sinais clínicos. Dessa forma, o estudo da evolução da doença nos cães tem trazido muitas informações a respeito do desenvolvimento da infecção e dos mecanismos imunológicos envolvidos na resistência ou susceptibilidade a esse parasito (Moreno et al., 2002).

As manifestações clínicas da LVC são altamente variáveis. Os animais, uma vez infectados, podem permanecer em um quadro infeccioso assintomático ou podem apresentar uma doença progressiva com sinais clínicos variados como hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, lesões cutâneas, alopecia, apatia, onicogribose, anorexia e perda de peso (Reis et al., 2006). Alguns estudos como os de Molina et al., 1994 e Almeida et al., 2005, realizados na Colombia, Espanha e Brasil respectivamente, apontam correlação positiva entre presença destes sinais clínicos e a capacidade dos reservatórios em transmitir a infecção.

A presença de infecção latente nos cães durante toda sua vida é muito comum podendo contribuir para manutenção dos parasitos nas regiões endêmicas (Gradoni et al, 1987; Courtenay et al, 2002). Os dados da literatura são muito controversos a respeito da transmissão da infecção por cães assintomáticos e sintomáticos, porém sugerem que esse fator é dependente da espécie de *Leishmania* e das diferenças geográficas (Verçosa et al.,2008).

Chagas et al (1937 e 1938) primeiramente relataram a existência de cães infectados na mesma região onde foram detectados casos humanos e mais tarde outros trabalhos mostraram o cão como principal fonte de infecção para os flebotomíneos (Margonari et al., 2006).

### 1.3. Aspectos clínicos da LVC

Após infectado, ocorrerá no organismo do animal uma proliferação parasitária e celular, e ainda uma produção de grande quantidade de imunocomplexos que irão se depositar na parede dos vasos e posteriormente ocorrerá a formação de processos inflamatórios degenerativos e necróticos em diversas regiões do organismo, constituindo o componente mais patogênico da enfermidade (Noli, 1999; Ferrer, 2002).

Diversas são as formas clínicas dessa doença no cão, podendo ser denominadas como aguda, subaguda, crônica, assintomática e sintomática, e essa variedade também é refletida no seu período de incubação que pode variar de poucos meses até anos. A variabilidade de sinais clínicos apresentados pelos cães com LVC levou alguns grupos de pesquisadores a classificarem os animais sintomáticos como oligossintomáticos e polissintomáticos. Esta classificação, no entanto, difere de acordo com os autores. Macianti et al. (1988), por exemplo, consideram os cães com perda de peso moderada e/ou pêlo opaco como oligossintomáticos. Por outro lado, Molina et al. (1994) consideram os animais que apresentam aumento dos linfonodos e onicogrifose ou dermatite/depilação, perda de peso e pêlos opacos como oligossintomáticos, uma classificação semelhante aquela do Ministério da Saúde que preconiza que animais com presença de adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pêlo opaco são oligossintomáticos. A mesma variação ocorre em relação aos cães polissintomáticos conforme descrito no quadro abaixo.

#### **Quadro 1 – Classificação da LVC de acordo com os sinais clínicos.**

Mancianti et al. (1988)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Assintomáticos: ausência de sinais sugestivos de infecção por <i>Leishmania</i></li><li>- Oligossintomáticos: perda de peso moderada e/ou pêlo opaco</li><li>- Sintomáticos: todos ou alguns dos sinais severos da doença (lesões cutâneas, particularmente no focinho e nas orelhas, caracterizadas principalmente pela alopecia, descamação e eczema, pêlo opaco, pequenas úlceras nas orelhas, focinho, cauda e</li></ul>
-------------------------	--

	<p>articulações, linfadenopatia, onicogribose, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia e hemorragia intestinal, edema das patas, vômitos e epistaxe.</p>
Molina et al., (1994)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Assintomáticos: cães sem sinais clínicos sugestivos da infecção por <i>Leishmania</i>.</li> <li>- Oligossintomáticos: aumento dos linfonodos e onicogribose ou dermatite/depilação, perda de peso e pêlos opacos.</li> <li>- Polissintomáticos ou sintomáticos: todos ou alguns sintomas mais comuns incluindo 3 ou mais sinais da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose, dermatite/depilação), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paralisia dos membros caudais.</li> </ul>
Ministério da Saúde (2006) Secretaria de Vigilância em Saúde - Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Assintomáticos: ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por <i>Leishmania</i>.</li> <li>- Oligossintomáticos: presença de adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pêlo opaco.</li> <li>- Sintomáticos: todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paralisia dos membros posteriores.</li> </ul>
Barcelos, (2009)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Assintomáticos: ausência de sinais clínicos característicos da infecção por <i>Leishmania</i> spp.</li> <li>- Oligossintomáticos: cães que o exame clínico demonstra linfadenopatia, moderada perda de peso e/ou alopecia acompanhada de lesões cutâneas.</li> <li>- Polissintomáticos: os cães nesta fase clínica apresentam as seguintes características, alterações cutâneas (alopecia, dermatites esfoliativas ou úlceras), onicogribose, ceratoconjuntivite e caquexia.</li> </ul>

Dentre os sinais clínicos mais frequente nos cães doentes, estão linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e alterações cutâneas, conforme mostra o quadro acima.

A esplenomegalia é característica marcante da LV, e foram descritas alterações como: hiperplasia e hipertrofia da polpa vermelha em cães infectados, bem como, infiltrado de células mononucleares e plasmócitos. Na polpa é comum encontrar a substituição de macrófagos por linfócitos em decorrência da hiperplasia e hipertrofia dessa região (Reis et al.,2008). As lesões hepáticas têm sido reportadas em roedores e humanos, no entanto em cães naturalmente e experimentalmente infectados, estas têm sido relativamente pouco descritas. As lesões graves são apenas encontradas em cerca de 5% dos animais doentes e ocorrem quando a *Leishmania* spp. se multiplica nos macrófagos hepáticos dando origem a uma hepatite crônica (Monteiro, 2010).

Entre as alterações localizadas e generalizadas presentes nos linfonodos dos cães, é comum encontrar aumento do tamanho (Rogers et al., 1993), inflamação crônica, com hiperplasia e hipertrofia das zonas cortical e medular (Lima et al., 2004). Já entre as lesões de pele é descrita a ocorrência de dermatite crônica proliferativa, que pode se apresentar como dermatite descamativa-pustular, ulcerativa ou nodular. A recorrente aceleração no crescimento das unhas pode ser principalmente em decorrência da redução da mobilidade do animal doente bem como de uma possível ação do parasito na matriz ungueal (Lins et al.,2003).

Mais raramente, podem ser encontradas lesões que comprometam os testículos, próstata, bexiga, pulmão, intestino, sistema nervoso central, olho, zonas articulares, entre outros (Campillo et al., 1999). Segundo Feitosa (2000), podem ainda ocorrer distúrbios da locomoção, poliartrite, polimiosite, úlceras interdigitais, periosteite osteolítica proliferativa evidente em alguns casos.

Outros aspectos como alopecia, tem ainda sido explicada através da ação do parasito no folículo piloso, levando a atrofia da matriz pilosa e hiperqueratinose além da produção alterada de ácido pantotênico e deposição de imuno complexos na pele induzindo uma forte resposta imune (Azevedo et al., 2003).



**Figura 2. Principais sinais clínicos em cães infectados por *Leishmania chagasi*.** A - lesões de pele, B - alopecia e perda de peso, C - linfadenopatia e D - uveíte.

#### 1.4. Aspectos laboratoriais da LVC

Conforme variação dos achados clínicos observados acima, a obtenção de conhecimentos detalhados de outros parâmetros como: imunológicos, histopatológicos e laboratoriais são fundamentais para o entendimento de uma doença tão complexa.

Os achados laboratoriais apresentam-se principalmente por alterações hematológicas como a anemia, geralmente normocítica normocrômica, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, hiperproteinemia, trombocitopenia, leucopenia associada à linfopenia ou leucocitose (Ciaramella et al., 2003)

O acompanhamento em conjunto das funções hepática e renal dos cães com LV não tem nenhum valor preponderante para o diagnóstico da doença, porém estes parâmetros podem fornecer dados para a avaliação do estado clínico dos animais, do prognóstico da doença e da evolução de cães tratados (Costa-Val et al., 2007). Dentre estes, podemos

destacar o monitoramento das enzimas Fosfatase Alcalina, Alanina Aminotransferase, Aspartato Aminotransferase e dos metabólitos como: Uréia, Creatinina, Albumina e Proteínas Totais.

Ciaramella (1997) descreve que a maioria das alterações no proteinograma sérico de cães infectados por *Leishmania* consistem em elevações enzimáticas, causadas por distúrbios da síntese hepática, da perda renal em casos de doença glomerular, ou até, associada a uma série de doenças crônicas. A hiperproteinemia nos cães com leishmaniose é decorrente de uma resposta imune humoral policlonal de linfócitos B, onde se observa aumento de gamaglobulina, diminuição de albumina e inversão na relação albumina/ globulina (Ciaramella et al., 1997; Ferrer et al., 1997 e Reis et al., 2006) . Na infecção por *Leishmania chagasi* as doenças hepáticas, resultam em acentuada tumefação dos hepatócitos – lipidose hepática, inflamação do parênquima hepático e podem induzir o aumento de enzimas como a fosfatase alcalina sérica.

Uma das características marcantes da LVC é o desenvolvimento de insuficiência renal crônica, que na maioria das vezes, é a principal causa de morte dos cães doentes. Ela se dá pelo desenvolvimento lento e progressivo das lesões renais irreversíveis e perda de função renal, que é consequência da deposição glomerular de complexos imunocirculantes (Dietze, 1997 e Luvizotto, 2006). De acordo com Almeida et al. (2005) e Dias et al. (2008) em estágios avançados de LVC, os valores médios de uréia, creatinina e ALT são elevados, mas a porcentagem desses casos é relativamente baixo. Rigo et al. (2009) sugere que o comprometimento renal no calazar deve-se tanto à ação direta da *Leishmania* no interstício renal, quanto ao tratamento com as medicações leishmanicidas. Desta forma, é interessante ter conhecimento da função renal basal, através de urinálises, para avaliar comorbidades monitorando mais de perto a função renal.

Larangeira (2008) sugere que a elaboração de um perfil clínico, bioquímico e imunopatológico pode servir como base para esclarecer questões relacionadas à evolução da infecção no cão, servindo para identificar inclusive, animais infectados transmissores e não transmissores do parasito , favorecendo assim um possível controle da doença.

Além das provas bioquímicas, os exames sorológicos específicos para detecção de anticorpos para *Lesihmania* incluem, a imunofluorescência indireta (IFI), a reação de fixação de complemento (RFC) e o ELISA (ensaio imunoenzimático) (Ribeiro, 2005) . São realizados

ainda, exames para detecção de parasita na pele ou através dos esfregaços de medula óssea e punção dos linfonodos que indicam a infecção, porém não necessariamente a doença (Ribeiro, 2005).

Embora, a utilização dos testes acima sejam mais viáveis economicamente e rotineiramente, a sensibilidade e especificidade das técnicas de ELISA e IFA são bastante questionadas e consideradas baixas, ocasionando taxas de infecções subestimadas e conseqüentemente permitindo a manutenção de animais infectados nas áreas endêmicas (De Paula et al., 2003). O uso do ELISA para diagnóstico é muito questionado pela ocorrência de reações cruzadas com outras infecções como por *Trypanosoma cruzi* e Babesia.

Silva et al (2005), ressaltou a necessidade de se implementar medidas de controle da LV levando-se em conta as diferenças microambientais de cada região e sugerem que o uso da técnica de Western blot seria o mais adequado para o diagnóstico da leishmaniose canina, permitindo a detecção precoce dos animais infectados, identificando inclusive dentre esses animais quem são potenciais transmissores da infecção para o flebótomo.

A utilização da reação em cadeia da polimerase, é aplicada para o diagnóstico de várias doenças parasitárias, incluindo a leishmaniose, e essa técnica mostra maior especificidade e sensibilidade para detecção de DNA gênomico do parasito, em amostras como sangue total, punção de medula óssea, linfonodos e fragmentos de pele. A técnica de PCR em tempo real foi recentemente introduzida para detectar quantitativamente e diferencialmente *Leishmanias* no organismo ( Francino et al., 2006; Van der Meide et al., 2005; Manna et al., 2009).

Manna et al (2009), demonstraram por PCR em tempo real, a relação entre a carga de *Leishmania* e as diversas manifestações clínicas apresentadas por cães infectados, mostrando ainda, que a quantificação de citocinas pode ser importante para o acompanhamento do desenvolvimento da doença em cães assintomáticos (Manna et al., 2006).

Até o momento as abordagens quantitativas e qualitativas tornaram-se as ferramentas mais importantes para o monitoramento da infecção, tanto em animais que não recebem tratamentos, como naqueles em que são aplicadas quimioterapias leishmanicidas.

## 1.5. Aspectos imunológicos da LVC

Estudos realizados em cães com infecção natural ou experimental com *L. infantum/chagasi* têm revelado que muitos animais sobrevivem à infecção, desenvolvendo uma resposta imune celular específica para o parasito, a qual pode resultar em resistência.

Em modelos murinos suscetíveis a infecção, foi detectada a presença de resposta do tipo Th2 com a produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, bem como inibição da ativação de macrófagos e proliferação celular, acompanhada de resposta humoral com secreção de anticorpos específicos (Etges and Muller, 1998; Launois et al., 1998; Solbach; Laskay, 2000). Por outro lado, animais resistentes demonstraram uma resposta imune celular muito ativa do tipo Th1, dando lugar à produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e outras interleucinas como IL-12 e IL-2 (Corrales & Moreno, 2006). Estas citocinas induzem a ativação dos macrófagos, para posterior destruição intracelular do parasito (Campillo et al., 1999).

Entretanto, a doença canina, de forma similar ao observado em humanos, apresenta um espectro imunológico bem mais complexo que demonstrado em modelos murinos. Lage et al. (2006), utilizando a técnica de RT-PCR, demonstraram que existe uma produção balanceada de citocinas dos padrões Th1/Th2 no baço de cães infectados. Esses autores demonstraram que houve uma predominância de IL-10 e IFN- $\gamma$  as quais foram relacionadas à carga parasitária e a progressão da infecção. Em se tratando das citocinas inflamatórias, Lima et al. (2006) demonstraram que cães com LV secretam elevadas concentrações de IL-6, mas baixas concentrações de TNF- $\alpha$ , quando comparados a cães sadios.

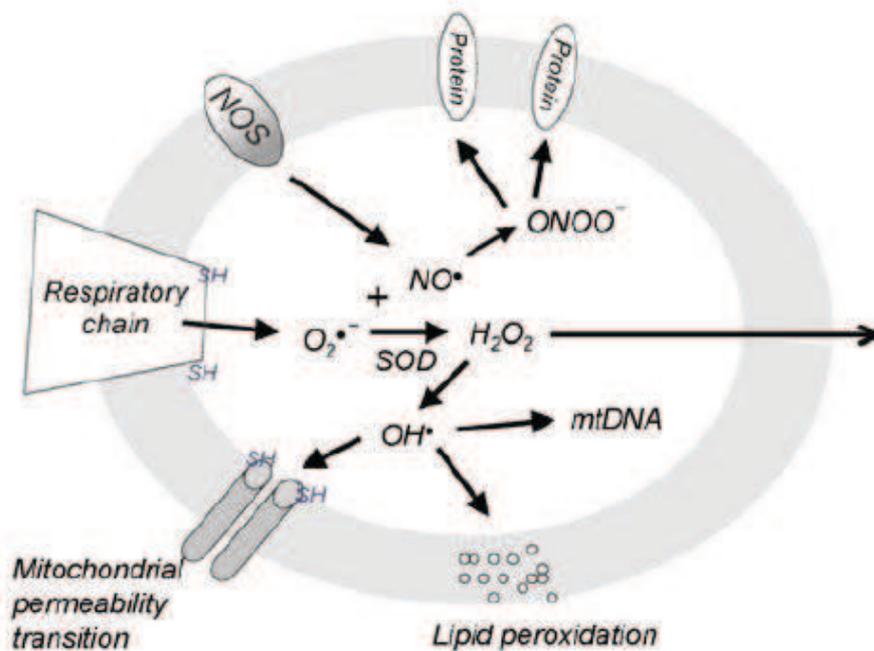
Em áreas endêmicas para calazar existem cães sintomáticos que apresentam respostas imunes celular e humoral anti-*Leishmania* eficazes, e ainda assim, apresentam doença progressiva e, concomitantemente, existem cães que não apresentam resposta humoral ou celular, ou ambas, e permanecem assintomáticos (Leandro et al., 2001).

Em muitas situações, apesar da resposta imune humoral não estar comprometida nos cães com LV, a resposta celular mediada por células T parece ser suprimida (Pinelli et al., 1994; Martinez-Moreno et al., 1995; De Luna et al., 1999; Campino e Abranches, (2002). Cabral et al. (1992), Carvalho et al. (1981), Sacks et al. (1987), Pinelli et al. (1999a,b), associaram a resposta protetora à LVC a uma predominância de resposta celular, seguida de

forte atividade proliferativa de mononucleares de sangue periférico a antígenos de *Leishmania*, acompanhada da secreção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  culminando na ativação de macrófagos e produção de radicais livres, tais como superóxido e óxido nítrico, essenciais para a eliminação do parasita (Kontos; Koutinas, 1993; Pinelli et al., 1995; Ferrer, 2002).

Na leishmaniose a indução de óxido nítrico (NO) pode ser um dos principais mecanismos efetores utilizados pelos macrófagos para eliminação de *Leishmania* (Liew et al., 1999). Já foi demonstrado que animais infectados apresentam ativação da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) em órgão infectados (Bories et al., 1997), entretanto, são insuficientes, os estudos relacionando a presença de óxido nítrico com resistência à infecção nos humanos e nos reservatórios caninos. Além disso, uma das moléculas fundamentais na indução da produção de óxido nítrico é o IFN- $\gamma$ , e conforme demonstrado por Santos-Gomes et al. (2002), cães recém-infectados apresentam uma inibição da produção desta citocina, sugerindo um papel imunomodulador do parasito que inibiria a ativação dos macrófagos e conseqüentemente a produção de óxido nítrico.

O óxido nítrico é descrito como responsável pela atividade leishmanicida do macrófago, ele é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase em duas etapas, pela oxidação do aminoácido L-arginina produzindo em partes iguais L-citrulina e NO (Miranda et al., 2001). A produção destes radicais é controlada em parte por um grupo de enzimas que são descritas por serem importantes na sobrevivência do parasito durante a infecção. Dentre elas, a superóxido dismutase (SOD), que faz parte de um grupo de metaloenzimas com função de proteger as células aérobicas da ação do ânion superóxido. Essa reação de dismutação do ânion superóxido dá origem a outros compostos microbicidas como peróxido de hidrogênio (Szeto., 2006).



**Figura 3. Reação de dismutação do ânion superóxido que dá origem ao peróxido de hidrogênio.** Fonte: Szeto, 2006

A participação destes radicais são determinantes para a sobrevivência de microorganismos como *Leishmanias* que residem intracelularmente em macrófagos de mamíferos, esses metabolitos são gerados, portanto como resultado do seu próprio metabolismo aeróbico ou durante os processos de fagocitose e ativação do “burst respiratório”.

## 2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses levam a óbito aproximadamente 50.000 indivíduos anualmente, sendo um grupo de doenças que se encontram como um dos seis maiores problemas de saúde pública acometendo cerca de 88 países. Nos últimos anos, a letalidade da leishmaniose visceral vem aumentando gradativamente, passando de 3,6% em 1994 para 6,7% em 2003 e 8,4% em 2004 (MS, 2006)

O fato é que atualmente a leishmaniose visceral canina é uma endemia constante e em progressão no Brasil e está associada ao aparecimento de casos humanos. Os estados localizados no Norte e Nordeste do país são reconhecidamente os mais afetados com esta doença que apresenta dependência multifatorial para seu desenvolvimento e manutenção nessas regiões.

Estudos epidemiológicos e a investigação de parâmetros clínicos, laboratoriais e imunológicos que possam determinar o estabelecimento de resistência ou susceptibilidade a doença no cão, são fundamentais por fornecerem ferramentas para a implantação de metas de controle nas áreas endêmicas. Além disso, no Brasil poucos trabalhos relacionam outros fatores como sexo, raça, convivência com outras espécies e faixa etária como indicadores de predisposição, embora na Europa vários trabalhos já evidenciem a importância destas variáveis no desenvolvimento da doença em animais naturalmente infectados.

Por tal fato, buscamos trabalhar em um município endêmico para LVC localizado no estado do MA, chamado Raposa. Essa região contida de manguezal e com clima úmido, foi o local escolhido para primeira etapa deste estudo. É uma área de urbanização recente e agrega vários fatores que poderiam favorecer a manutenção da doença, o que de fato acontece como mostram os dados de infecção humana (Caldas et al., 2001). Além disso, de acordo com Garcia et al. (2004) essa região apresenta grande prevalência de cães infectados por *L.chagasi*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Gerais

Estudar aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos de cães naturalmente infectados com *L.chagasi*, residentes em área endêmica do Estado do Maranhão.

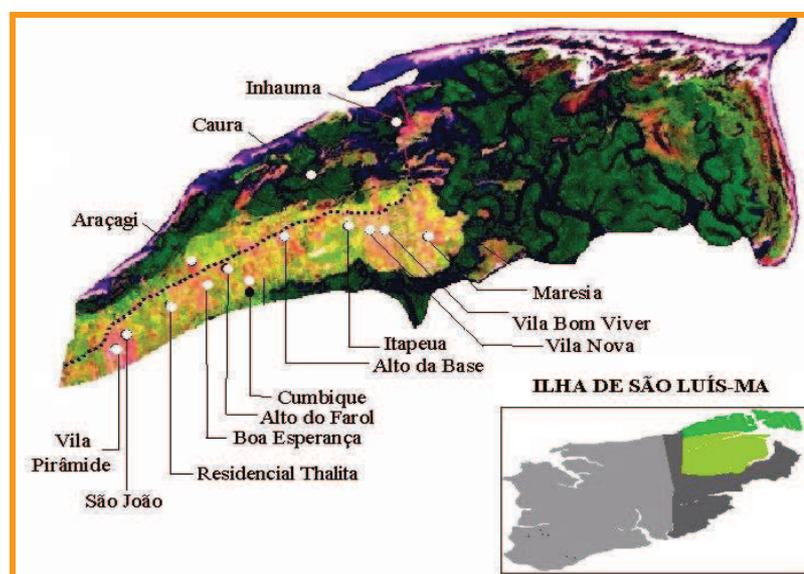
##### 3.1.1. Específicos

- Atualizar os dados referentes à leishmaniose visceral canina no município da Raposa-MA, área endêmica para doença
- Identificar o perfil (idade, regime de criação, convívio ou não com outras espécies, tipo de alimentação e sexo) dos cães residentes em área endêmica para LV
- Correlacionar as concentrações sorológicas de IgG anti-*Leishmania* e de suas subclasses IgG1 e IgG2 com a sintomatologia clínica apresentada por cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*
- Quantificar as concentrações séricas de óxido nítrico em cães soropositivos
- Quantificar a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , no soro e nos sobrenadantes de cultura de células de baço e linfonodo poplíteo

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Área de estudo

A localidade Vila Nova, situada no município de Raposa ( 2° 26'S e 44°06'W ), estado do Maranhão – Brasil, é o local de origem dos cães que participaram da primeira etapa desta pesquisa. O município teve sua fundação na década de 1990 e consistia basicamente em uma vila de pescadores, mas nos últimos anos tem se tornado uma área de intenso povoamento e atualmente novas vilas são criadas sem qualquer infra-estrutura, desmatando e avançando em áreas de mata antes não exploradas. O município apresenta área de 64 Km<sup>2</sup> com uma população de aproximadamente 20.698 habitantes distribuídos em 42 localidades, é um dos quatro municípios que compõem a ilha de São Luis, e localiza-se a aproximadamente 28 Km da capital do Estado do Maranhão (IBGE, 2005).



**Figura 4. Áreas selecionadas baseadas na notificação de casos de LVA de 1997 a 2005.**

Fonte: Secretária do Estado do Maranhão

## **4.2 Cães e desenho do estudo**

Inicialmente foi realizado um censo na localidade de Vila Nova, onde foi detectada a presença de 233 cães domiciliados. Destes, 69 apresentaram título de IgG anti-*Leishmania* positivos, constituindo uma população de 29,6% de soropositivos.

Seguidos quatro meses da primeira visita a localidade de Vila Nova, foi realizada uma nova coleta de sangue. Dos 69 cães anteriormente soropositivos, foram localizados apenas 27 animais, totalizando perda de 61%. Os animais não localizados morreram, fugiram ou mudaram junto com seus donos para outras localidades. Dessa forma, a amostra deste estudo foi constituída de 27 cães domiciliados em Vila Nova no ano de 2005 e soropositivos para *Leishmania chagasi* pelo teste de ELISA. Oito cães sorologicamente negativos foram incluídos no grupo controle.

Este estudo foi submetido ao Comitê de ética e experimentação animal da UEMA (Universidade Estadual do Maranhão) - protocolo nº 19/ 05 data: 23/05/05.

## **4.3. Aplicação de questionários**

Durante a avaliação foram também realizadas entrevistas domiciliares junto aos proprietários dos cães, que incluíram perguntas como: idade, regime de criação, convívio ou não com outros animais, tipo de alimentação e sexo dos animais.

## **4.4. Avaliação clínica**

Os 27 animais localizados foram capturados e encaminhados para o Centro de Controle de Zoonoses da Universidade Estadual do Maranhão. Foi realizada a avaliação e classificação clínica dos animais pelo médico veterinário da equipe. Foram atribuídos escores de 0 a 10 de acordo com a presença e gravidade dos sinais clínicos, incluindo: aumento do

linfonodo poplíteo, comprometimento da pele, alteração no peso corporal, presença de lesões oculares, entre outros conforme descrito por Manna, et al (2009).

De acordo com nossa adaptação, os animais foram classificados somente em: Assintomáticos (N=10) - cães sem sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania chagasi* e Sintomáticos (N=17) - cães com sinais clínicos da doença. Foi avaliada a presença de aumento dos linfonodos, onicogribose ou dermatite/depilação, perda de peso, pêlos opacos, ceratoconjutivite e uveíte.

Após a avaliação clínica e o consentimento do proprietário do animal doando o mesmo para pesquisa (Apêndice I), foram coletados 10 mL de sangue periférico de cada animal e após a retração do coágulo, o soro separado por centrifugação a 1500rpm por 10 minutos e estocado a -20°C até o momento dos ensaios. Após a pré-anestesia com cloridrato de xilazina (1mg/kg), cloridrato de ketamina (10mg/kg) e diazepam (1mL/10kg) por via intramuscular, os animais foram eutanasiados por aplicação de Tiopental Sódico diluído a 2,5%, em quantidade suficiente para a obtenção de parada cardíaca e respiratória, após esse procedimento foram coletados fragmentos de baço e linfonodo poplíteo.

#### **4.5. Quantificação de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania***

Anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* foram detectados no soro dos animais pelo método de ELISA. As placas de microtitulação (Limbro/Titertek) foram sensibilizadas com antígeno de *Leishmania* na concentração de 10µg/mL (100µL/poço), diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6), e incubadas a 37°C por 1h. Após a incubação foram lavadas 3 vezes com PBS Tween a 0,05% e bloqueadas (250µL/poço) com PBS/BSA 5% e novamente incubadas a 4° C overnight. Após três lavagens com PBS Twee 0,05% os soros dos animais da área juntamente com o soro dos cães controles positivos e negativos que haviam sido previamente diluídos (1/400) em PBS/BSA 5%, foram adicionados (100µL/poço) nas placas e incubados por 1 h a 37°C. Após um ciclo de lavagens foram adicionados a cada placa os conjugados específicos para cão anti-IgG-fosfatase alcalina (Sigma), anti-IgG2-fosfatase (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) e anti-IgG1-peroxidase (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) diluído em PBS Tween 0,05% (1/2000,

100µl/poço). As placas foram incubadas a 37°C por 1h. Após outro ciclo de lavagem foi adicionado 1mg/mL do substrato p-nitrofenil fosfato (SIGMA Chemical Company, St Louis, MO, USA) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) para revelar as placas com anti-IgG/fosfatase e anti-IgG2/fosfatase. A reação foi interrompida 15 minutos depois pela adição de NaOH 3M (50µL/poço) e a leitura realizada a 405 nm. No caso do conjugado anti-IgG1/peroxidase foi adicionado o substrato tetrametilbenzidina (Sigma) diluído em 9 mL de tampão citrato fosfato (pH 5) acrescido de 1mL de DMSO (Sigma) e 2uL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 5 minutos a reação foi interrompida com 50uL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8N e a leitura foi realizada a 450 nm. O cut-off foi obtido calculando-se a média dos controles negativos mais três desvios-padrão. Os resultados foram expressos em densidade óptica ou em índice de aumento. O índice de aumento foi calculado levando-se em consideração as D.O. individuais divididas pela média do grupo controle negativo para cada uma das análises.

#### **4.6. Dosagem de nitrato no soro**

Alíquotas de 200 µl de soro foram colocadas em eppendorfs de 1,5 ml para desproteinização na presença de 20 µl de cloreto de zinco 1 M. Após o preparo das amostras, estas foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido para dosagem de nitrito e nitrato como forma indireta de avaliar a produção de óxido nítrico, conforme protocolo adaptado de Miranda et al. (2001).

#### **4.7. Cultura de células de baço e de linfonodo poplíteo**

Fragments do baço e o linfonodo poplíteo foram triturados em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 5 % de Soro Fetal Bovino, 100 µg/ml de estreptomicina e 100 UI/ml de penicilina (Gibco, NY). As células foram contadas e ajustadas para 3 x 10<sup>6</sup>/mL. A viabilidade celular foi determinada pelo Azul de Trypan. As culturas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 48 horas em placas de 48 poços (Costar, Corning

Incorporated, NY). Após esse período o sobrenadante das culturas foi coletado e armazenado a -20° C até a realização dos ensaios.

#### **4.8. ELISA para detecção de citocinas**

As concentrações de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram determinados no soro e no sobrenadantes das culturas de baço e linfonodo poplíteo conforme as especificações do Kit R&D Systems Cat.(Minneapolis, USA).

### **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). O teste de análise de variância ANOVA, foi utilizado para os estudos comparativos das médias dos valores de absorbância entre os grupos de cães soropositivos e o grupo controle. A correlação  $r$  de Pearson foi utilizada para avaliar a correlação entre os escores clínicos e os valores de absorbância de IgG, IgG1 e IgG2. Em todos os casos os resultados foram considerados significantes quando,  $p \leq 0.05$ . Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão dos grupos soropositivos em relação ou não ao controle (negativo), conforme o caso.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Distribuição de cães soropositivos para *Leishmania chagasi* na localidade de Vila Nova, município de Raposa no estado do Maranhão.**

#### **6.1.1. Porcentagem de cães com sorologia positiva para *Leishmania chagasi* na área de Vila Nova, Raposa-Ma.**

Foram encontrados 233 cães domiciliados na localidade de Raposa, sendo 123 machos (52,8%) e 110 fêmeas (47,2%). Baseados no cut-off estabelecido, o qual foi de 0,053, foram encontrados 69 cães com sorologia positiva para *L.chagasi*, constituindo uma soroprevalência para LVC de 29,6%.

#### **6.1.2. Distribuição quanto ao sexo**

De acordo com nossos achados na área de Vila Nova, Raposa-Ma, entre os 69 cães com sorologia positiva para *L.chagasi* 40 (58% ) eram machos e 29 (42%) fêmeas.

#### **6.1.3. Distribuição quanto ao tipo de alimentação e convívio com outros animais**

Em relação ao tipo de alimentação dos cães com sorologia positiva para *L.chagasi*, 54 (78%) se alimentavam de comida caseira, 4 (6%) de ração e 11 (16%) ração e caseira . De acordo com a presença de outros animais convivendo com os cães nas residências, 51 (74%) conviviam com outros animais e 18 (26%) não conviviam.

#### 6.1.4. Distribuição quanto ao regime de criação e idade dos animais

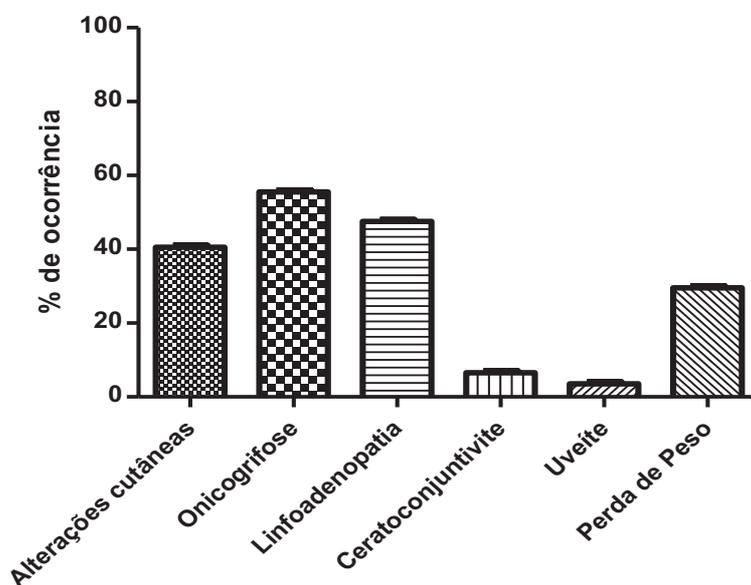
Em relação ao regime de criação dos cães com sorologia positiva para *L. chagasi* 34 (49%) viviam soltos e 35 (51%) confinados. Quanto à idade, o maior percentual de animais com sorologia negativa correspondia a cães jovens com faixa etária inferior a um ano. Já entre os soropositivos, o maior percentual estava entre cães na faixa etária entre 1 e 3 anos (Tabela 2).

**Tabela 2. Distribuição dos cães com sorologia negativa e positiva para *L.chagasi*, de acordo com a faixa etária.**

Faixa etária	Sorologia Negativa	Sorologia Positiva	Total
≤ 1	66 (40,2%)	8 (11,6%)	74 (31,8%)
1   3	62 (37,8%)	23 (33,3%)	85 (36,5%)
3   5	22 (13,4%)	20 (29,0%)	42 (18,0%)
≥ 6	10 (6,1%)	13 (18,8%)	23 (9,9%)
Não informado	4 (2,4%)	5 (7,2%)	9 (3,8%)

### 6.1.5. Avaliação clínica

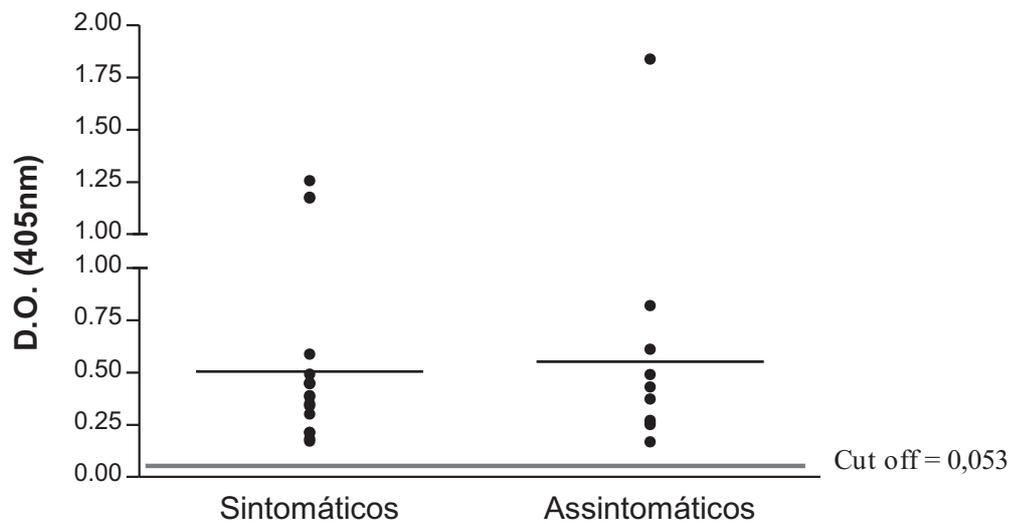
A avaliação clínica dos cães com sorologia positiva para *L.chagasi* demonstrou que 37% dos cães eram assintomáticos e 63% sintomáticos. Os sinais clínicos mais frequentes foram onicogribose e linfadenopatia, encontrados em 56% e 48% dos cães, respectivamente (Figura 5). Outros sinais também foram significativamente presentes como: alterações cutâneas e perda de peso.



**Figura 5.** Sinais clínicos mais frequentes em cães soropositivos para *Leishmania chagasi*. Os dados correspondem a um total de 27 cães domiciliados nessa região.

## 6.2. Quantificação de anticorpos *anti-Leishmania*

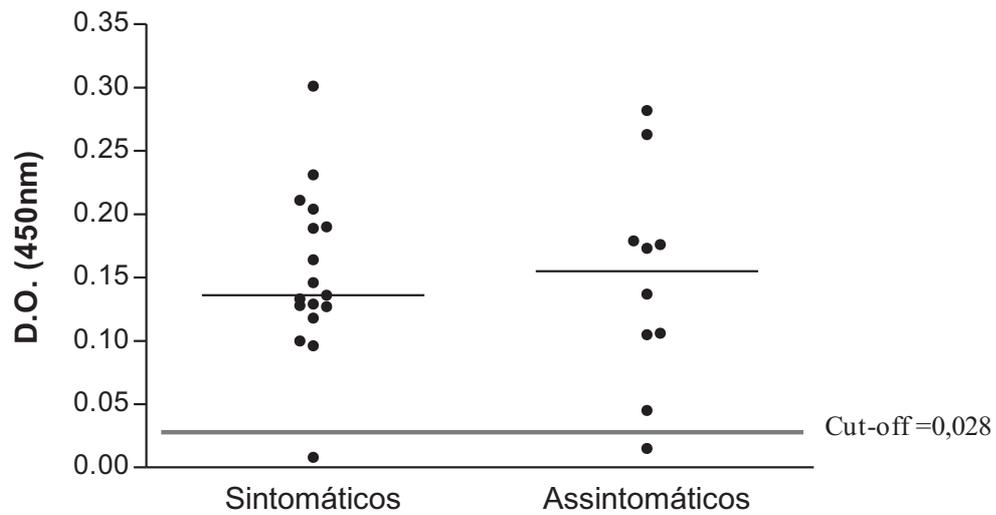
A produção de anticorpos IgG específicos para *Leishmania* não foi diferente entre os cães sintomáticos e assintomáticos, conforme mostra o gráfico abaixo.



**Figura 6. Títulos séricos de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães , assintomáticos e sintomáticos.** Os resultados estão expressos em densidade óptica (D.O). \*  $p \leq 0,05$  em relação aos assintomáticos.

### 6.3. Quantificação de anticorpos IgG1

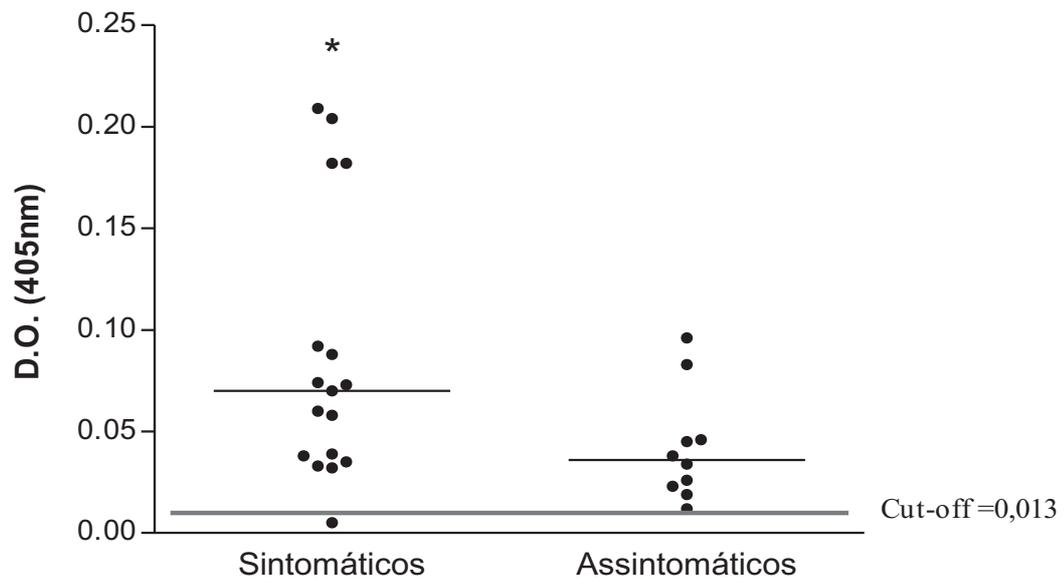
Em relação a produção da subclasse IgG1 não houve diferença entre os cães sintomáticos e assintomáticos.



**Figura 7. Títulos séricos de anticorpos IgG1 em cães assintomáticos e sintomáticos.** Os resultados estão expressos em densidade óptica (D.O). \*  $p \leq 0,05$  em relação aos assintomáticos.

#### 6.4. Quantificação de anticorpos IgG2

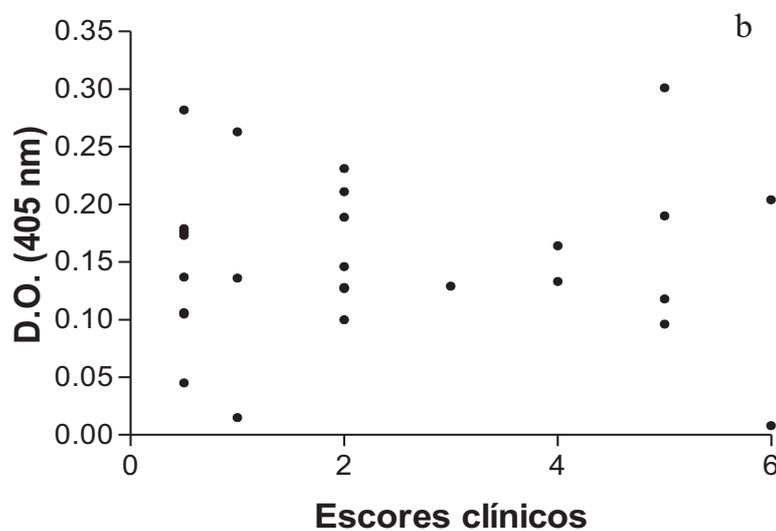
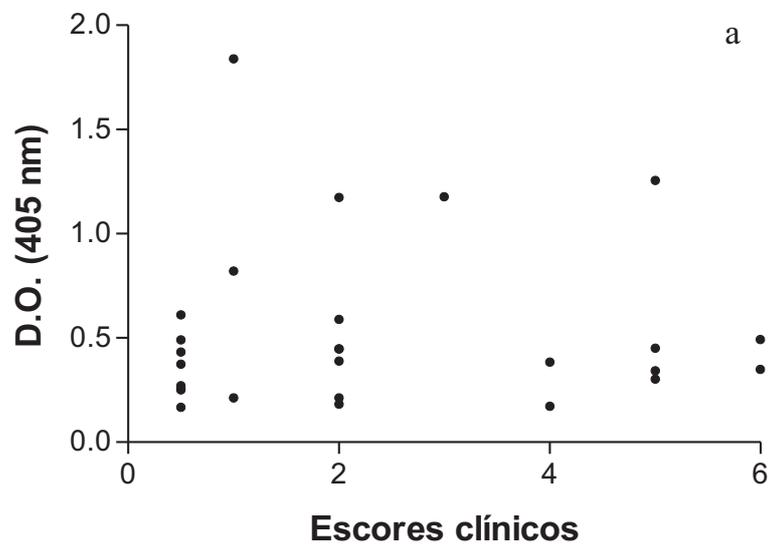
A produção da subclasse IgG2 foi consideravelmente mais elevada nos cães sintomáticos em comparação aos assintomáticos, conforme mostra a figura abaixo.

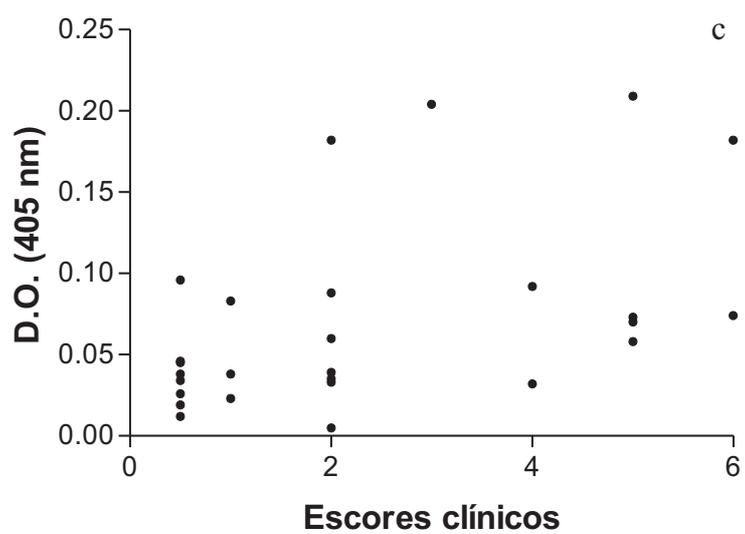


**Figura 8. Títulos séricos de anticorpos IgG2 em cães assintomáticos e sintomáticos.** Os resultados estão expressos em densidade óptica (D.O). \*  $p \leq 0,05$  em relação aos controles e #  $p \leq 0,05$  em relação aos assintomáticos.

### 6.5. Correlação entre sinais clínicos e produção de IgG, IgG1 e IgG2

A correlação entre gravidade de sinais clínicos e os valores de densidade ótica de IgG, IgG1 e IgG2 avaliada pela correlação  $r$  de Pearson mostrou-se negativa para IgG ( $r = 0,001$ ,  $p = 0,872$ ), negativa para IgG1 ( $r = 0,001$ ,  $p = 0,867$ ); e positiva, mas regular, para IgG2 ( $r = 0,1610$ ,  $p = 0,042$ ). Os diagramas de dispersão para os valores de D.O. para os anticorpos são mostrados abaixo.

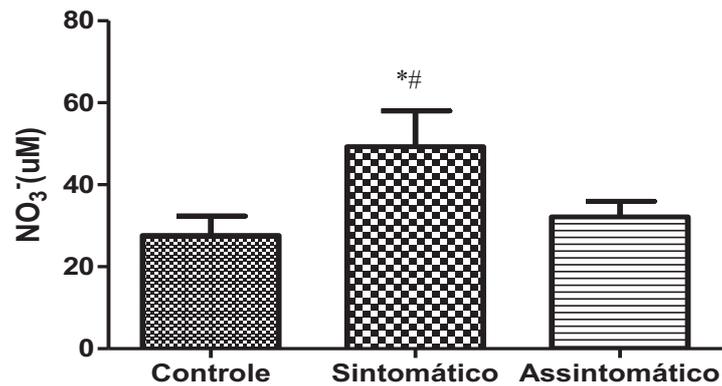




**Figura 9. Correlação entre IgG , IgG1 e IgG2 e gravidade dos sinais clínicos.** Diagramas de dispersão correspondentes a gravidade dos sinais clínicos encontrados por cão e o valor da densidade ótica obtido para IgG (a) e suas subclasses IgG1 (b) e IgG2 (c).

## 6.6. Quantificação de óxido nítrico

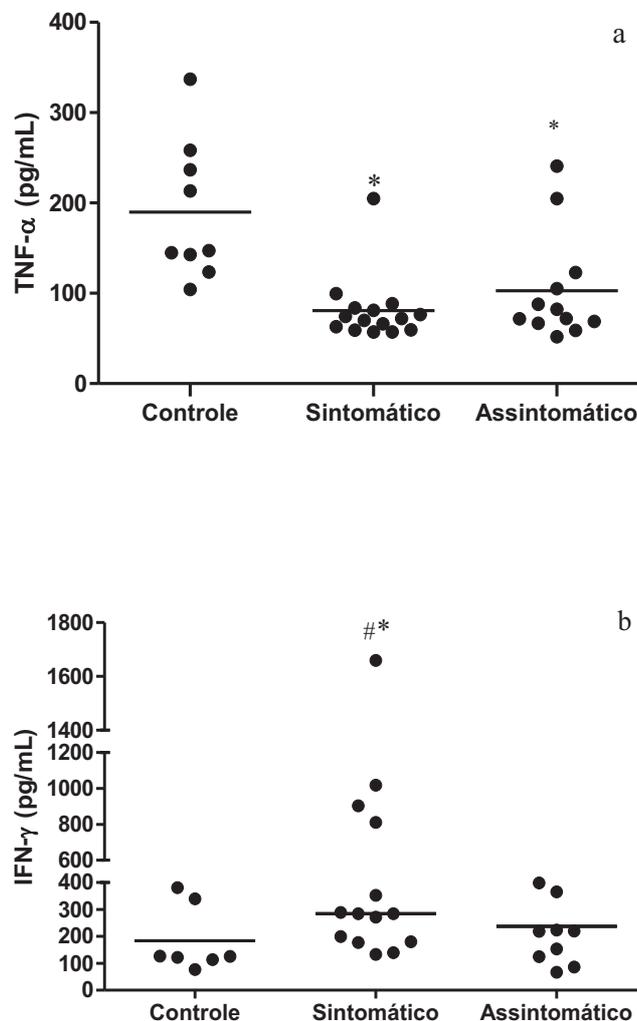
De acordo com os gráficos abaixo, os cães sintomáticos apresentaram maior produção de óxido nítrico em comparação ao animais do grupo controle e assintomáticos.



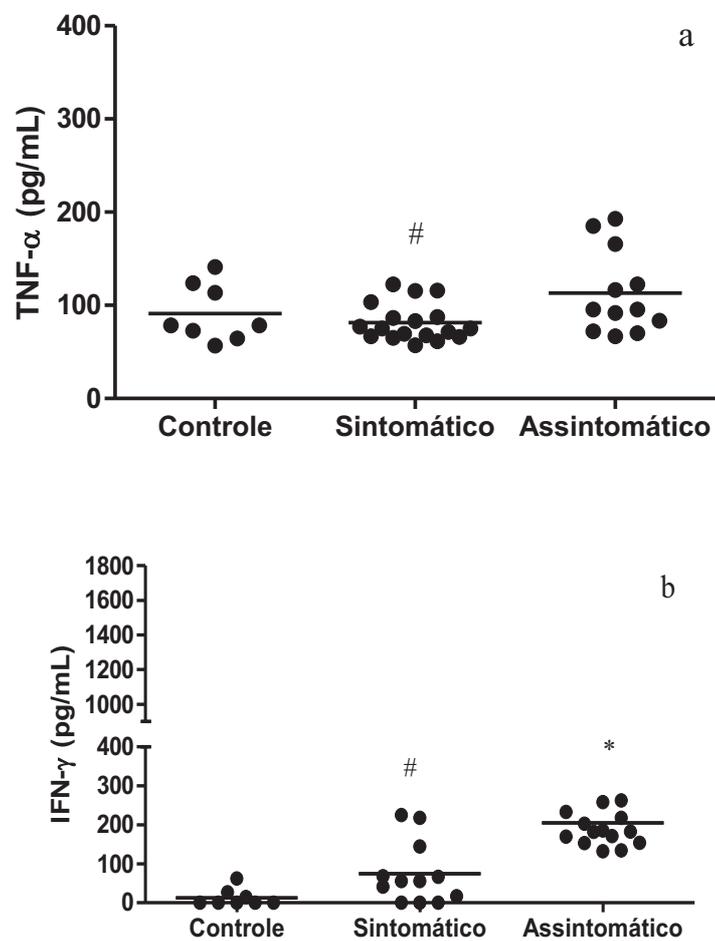
**Figura 10. Produção de óxido nítrico no soro de cães com sorologia negativa (Controle), assintomáticos e sintomáticos . Os resultados estão expressos em densidade óptica (D.O). \*  $p \leq 0,05$  em relação aos controles e #  $p \leq 0,05$  em relação aos assintomáticos.**

### 6.7. Quantificação das citocinas IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$

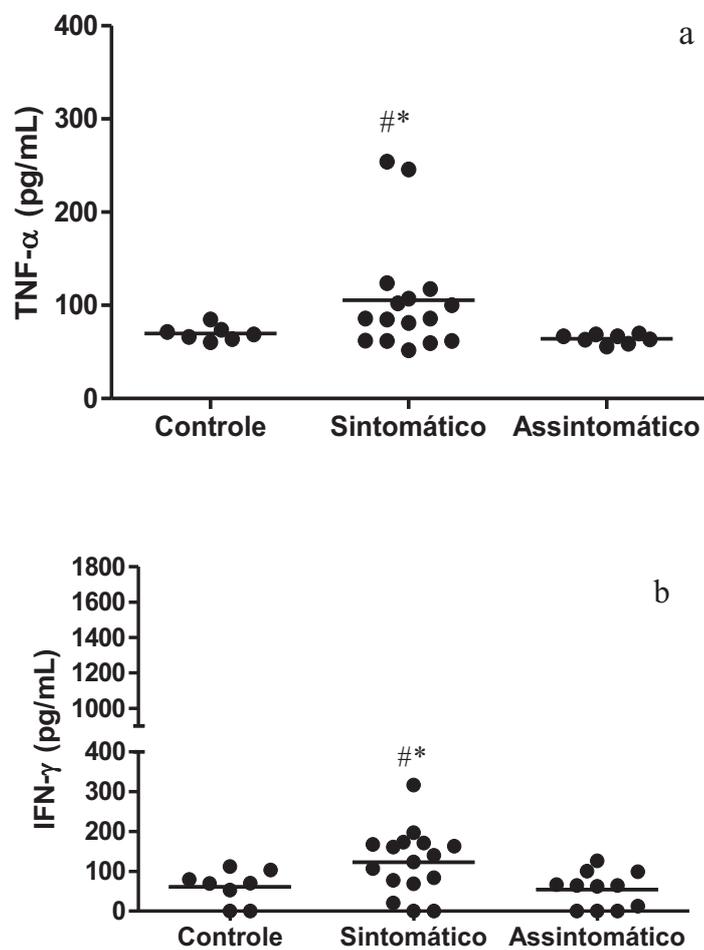
As citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  foram quantificados no soro e nos sobrenadantes das culturas de linfonodo e baço. No soro houve diminuição da produção de TNF- $\alpha$  nos animais infectados (assintomáticos e sintomáticos) em comparação ao controle. Este resultado foi oposto ao observado nos níveis séricos de IFN- $\gamma$ . O mesmo padrão se manteve no sobrenadante de cultura esplênica. Entretanto, nas culturas de linfonodo, tanto TNF- $\alpha$  quanto IFN- $\gamma$  aumentaram significativamente nos animais sintomáticos em relação aos demais grupos.



**Figura 11. Concentrações de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (a,b) no soro de cães não infectados (Controle), assintomáticos e sintomáticos. Os resultados estão expressos em pg/mL. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos controles e #  $p \leq 0,05$  em relação aos assintomáticos.**



**Figura 12. Concentrações de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (a,b) nos sobrenadantes de culturas de baço de cães não infectados (Controle), assintomáticos e sintomáticos.** Os resultados estão expressos em pg/mL. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos controles e #  $p \leq 0,05$  em relação aos assintomáticos.



**Figura 13. Concentrações de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (a,b) no sobrenadante de linfonodos de cães não infectados (Controle), assintomáticos e sintomáticos. Os resultados estão expressos em pg/mL. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos controles e #  $p \leq 0,05$  em relação aos assintomáticos.**

## 7. DISCUSSÃO

Em áreas endêmicas os cães tem sido descritos como principal reservatório doméstico do parasito *L.chagasi* (França-Silva et al., 2003). Existem diversos estudos sobre a prevalência da LVC em diferentes regiões do Brasil e geralmente estes mostram elevada variação entre as taxas.

No estado do Maranhão por exemplo, na capital São Luís e proximidades, existem estudos com diferentes resultados sobre a prevalência de LV nos cães. Melo et al. (2002) mostraram alta prevalência para LVC (64%) na região, enquanto Guimarães et al. (2005) encontraram prevalência de 21% e 25% em duas diferentes localidades do estado. Em nossa pesquisa 29,6% da população canina encontrava-se infectada.

Outros estudos sobre a soroprevalência da leishmaniose canina no Brasil mostram valores muito inconstantes, como os encontrados por Monteiro et al. (2005) com 4,9% em Montes Claros, MG; Nunes et al. (2001) em Bonito MS, 23,7%; Paranhos-Silva et al. (1996) com uma taxa de 23,5% em Jequié, BA; Galimberti et al. (1999) com 26,3% em Araçatuba, SP; Santos et al. (1998) encontraram 24% em Corumbá e Ladário, MS; Guerra et al. (2004) com 10,3% em uma aldeia indígena no estado de Roraima e Cabrera et al. (2003) encontrando 25% em Barra de Guaratiba, RJ.

Dentre os fatores que podem influenciar o comportamento e manutenção da infecção nessas regiões, estão além das condições sanitárias indesejáveis, as condições nutricionais, sexo e proximidade com outros animais. Como podemos observar aqui, o número de machos infectados foi aproximadamente 1.4 vezes maior que de fêmeas, isso com base no total da população infectada, o que possivelmente sugere que os machos são mais suscetíveis a infecção que as fêmeas. Dantas-Torres et al. (2006) em suas pesquisas, também já haviam demonstrado uma alta proporção de cães machos infectados por *L.chagasi*.

Abranches et al.( 1991); Amela et al. (1995) ; Amusatogui et al. (2003); Fisa et al.( 1999) e França Silva et al.( 2003) não identificaram sexo como importante fator de risco para LVC, embora Miranda et al. (2005) na Espanha tenham relatado maiores taxas de infecção também em machos.

Essa elevada quantidade de cães machos infectados e doentes em áreas endêmicas pode estar associado a fatores hormonais, estes podem induzir uma imunossupressão através da baixa regulação da atividade dos macrófagos (Ahmadi e MacCruden, 2006). Experimentalmente os hormônios sexuais podem ter efeito direto na evolução da infecção (Olsen e Kovacs., 1996), a resposta imunológica humoral e celular é mais intensa em fêmeas do que em machos. Liu et al. (2005) mostraram a atividade direta da testosterona no aumento da infecção de macrófagos por *L. donovani* e a diminuição da viabilidade celular por apoptose, acompanhado do aumento da expressão de Fas, FasL e Caspase 8. Mesmo em humanos a bastante tempo já é relatado que o homem adquire mais frequentemente a leishmaniose cutânea e visceral do que a mulher ( Shiddo et al., 1995).

A correlação do sexo com outros fatores, pode ser forte, agravantes para o estabelecimento da doença. A influência das condições nutricionais dos animais não está muito clara na LVC, porém Cerf et al., em 1987 já afirmava que má nutrição é de fato um fator de risco para desenvolvimento da LV e de acordo com Gradoni (1995) e Carvalho et al (2009), cães que consomem prioritariamente alimentos industrializados são mais resistentes a infecção e a progressão da doença, provavelmente devido as melhores condições de saúde que estes animais apresentam. De acordo com nossos achados 78% dos infectados se alimentavam de comida caseira e apenas 6% somente de ração, o que pode reforçar as informações acima.

Além desses fatores podemos ainda mencionar o convívio dos cães infectados com outras espécies e o regime de criação a que estes são submetidos. Nossos resultados mostram que 74% dos cães conviviam com outros animais e 26% não conviviam e em relação ao regime de criação, 49% viviam soltos e 51% confinados.

É comum a presença de outras espécies, nas residências onde estes cães habitam. Cabrera, (1999) já relatava a presença de gambás-de-orelha branca como um fator de risco para infecção nessas áreas. Na maioria dos casos são encontradas galinhas e gatos e é interessante notar o frequente aumento no número de gatos, acompanhado da redução na quantidade de cães nessas comunidades, talvez pelo fato da intensificação das campanhas contra LVC nas regiões. Galinhas e gatos podem ser outra fonte alimentar para os flebotomíneos e alguns autores já discutem o papel dos felinos como reservatórios de *L. chagasi* (Sherlock, 1996; Simões-Mattos et al.,2005; Maroli et al.,2007). Embora as

galinhas sejam resistentes a infecção elas podem servir como atrativo para os flebotômíneos e consequentemente sobre outros vetores.

Outro ponto importante a ser considerado é a idade destes animais. Nosso estudo mostrou que os cães jovens de 1 a 3 anos constituem mais de 60% da população, sendo também a faixa etária mais predominante com sorologia positiva para *L.chagasi*. Em geral os animais de área endêmica não possuem muita longevidade, principalmente pela associação de fatores já discutidos anteriormente, apesar disso Moreno et al. (2005), não sugerem a idade como um fator de risco para LVC, embora exista maior frequência em cães com menos de três anos de idade ou entre oito e dez anos.

A porcentagem de cães infectados morando em área onde a leishmaniose é endêmica tem grandes implicações na saúde pública. Autores como Molina et al. (1994), Abranches et al. (1991) e (1998) e Fisa et al. (1999). demonstraram que cães infectados, mas assintomáticos também são fontes de infecção para flebotômíneos apresentando parasitos na pele sadia e como consequência desempenham um papel ativo na transmissão da doença para humanos e na manutenção da mesma nos hospedeiros caninos.

Em comunidades endêmicas para leishmaniose é de se esperar que a maioria dos animais infectados seja assintomática, o que de fato foi demonstrado por Marzochi et al. (1985), Guimarães et al. (2005), Dantas Torres et al. (2006) e Garcia (2004), sendo que este também fez seu estudo no município de Raposa (localidades Vila Nova e Bom Viver). Estes trabalhos encontraram em torno de 60% de cães assintomáticos. Entretanto, outros estudos têm demonstrado que este padrão não é real para todas as comunidades situadas em áreas endêmicas. Em nossa pesquisa, por exemplo, apenas 37% dos cães avaliados eram assintomáticos, um percentual próximo ao encontrado por Mancianti et al. (1988) e Fisa et al. (1999), que encontraram 45% e 35% de assintomáticos, respectivamente. Estes dados podem sugerir um comportamento epidemiológico diferenciado para a infecção canina, dependendo do momento em que se realiza o estudo, tempo de infecção, do estado geral do cão (nutricional, imunológico, co-infecções) e da eficiência das medidas de controle da leishmaniose.

Neste trabalho, o sinal clínico mais freqüente nos cães sintomáticos foi onicogrifose, seguida de linfadenopatia e úlceras. O mesmo foi visto por Abranches et al. (1991), Nieto et

al. (1999), Solano-Gallego et al. (2001) e Almeida et al. (2005), embora Guimarães et al. (2005) tenham encontrado as lesões de pele como o sinal mais freqüente em animais doentes.

Estes autores sugerem que *L. chagasi* poderia, primariamente, induzir lesões cutâneas e só depois disseminar para os órgãos internos, hipótese que poderia ser sustentada por Reis et al. (2006) que demonstraram haver maior densidade parasitária na pele, mesmo na fase assintomática. Entretanto, em nosso estudo a linfadenopatia foi mais frequente que as alterações na pele.

A linfadenopatia seja ela local ou generalizada pode ocorrer devido ao aumento da proliferação de linfócitos B em detrimento das células T. Esses linfonodos apresentam-se reativos com a presença de uma variedade celular extensa como macrófagos (Gonçalves et al., 2003)

As evidências de que na leishmaniose visceral existe um comprometimento imunocelular acentuado, enquanto a resposta imune humoral permanece ativa com produção alta de anticorpos específicos (Reis et al., 2006), nos levou a investigar a produção das subclasses de IgG, especificamente IgG1 e IgG2 nos animais soropositivos.

Anticorpos da subclasse IgG1 são associados à susceptibilidade e gravidade da doença, enquanto o aumento da subclasse IgG2 é encontrado em cães naturalmente resistentes (Solano-Gallego et al., 2001; Quinnell et al., 2003; Rafati et al., 2005).

Os dados de IgG1 e IgG2 encontrados em nosso estudo mostram que os títulos de IgG1 nos cães soropositivos foram semelhantes entre os assintomáticos e sintomáticos. Por outro lado a produção de de IgG2 nos sintomáticos foi significativamente maior que nos cães do grupo assintomático. Resultados semelhantes foram encontrados por Leandro et al. (2001) e Reis et al. (2006) em diferentes modelos de infecção. Leandro et al. (2001), utilizando cães experimentalmente infectados com *L. infantum* demonstraram que a produção de IgG1 anti-*Leishmania* é similar nos cães assintomáticos e sintomáticos. À mesma conclusão chegaram Reis et al. (2006) utilizando cães naturalmente infectados com *L. chagasi*. Entretanto, Deplazes et al. (1995) e Nieto et al. (1999), utilizando modelo de infecção experimental de cães com *L. infantum*, encontraram em seus estudos correlação positiva entre IgG1 e animais sintomáticos.

Em nosso estudo, a correlação dos valores das subclasses de IgG e o número de sinais apresentados pelos cães nas várias fases da doença demonstrou correlação positividade somente para IgG2. Este dado reforça os achados de Reis et al. (2006) os quais sugeriram que IgG2 está associada com a morbidade pela LVC, sendo positivamente correlacionada com os mais severos sinais clínicos da doença e a alta densidade parasitária.

As diferenças encontradas nos diversos trabalhos em relação a IgG1 e IgG2 podem estar relacionadas a variáveis diversas como: o número de cães utilizados, o tempo de infecção e de acompanhamento desses cães, o fato de ser uma infecção natural ou experimental, a cepa utilizada para a infecção, o tratamento dos cães para outras parasitoses, entre outras variáveis.

Quando os cães foram analisados de forma individual, considerando o índice de aumento de IgG, IgG1 e IgG2 em relação aos seus respectivos controles negativos, verificou-se que em todos os grupos sintomatológicos avaliados havia cães que apresentavam uma resposta humoral muito baixa e outros que apresentavam resposta humoral muito elevada indicando que não há um padrão único de resposta entre os animais, nem mesmo quando eles se encontram na mesma fase clínica da infecção. Não houve correlação individual entre as duas subclasses e nem entre o tipo de sinal clínico apresentado e os títulos de anticorpos (dados não mostrados), o que sugere que a produção de subclasses depende de um contexto imunológico onde o sinal clínico em si é apenas uma das vertentes.

Os resultados apresentados em nosso estudo sugerem que a produção aumentada de IgG2 parece estar relacionada com o quadro mais grave da infecção. Entretanto, as variações individuais indicam que a utilização deste parâmetro como prognóstico da evolução da doença canina não deve ser feita de forma isolada, sem que haja o acompanhamento concomitante de sinais evidentes e de outros marcadores imunológicos menos variáveis.

Quando se avaliou a presença de nitritos/nitratos no soro dos animais, como forma indireta de avaliar a produção de NO, verificou-se que cães sintomáticos apresentam níveis séricos de nitrato significativamente mais altos que o observado nos animais controle e assintomáticos, sugerindo uma relação direta entre produção de NO e progressão da infecção, apesar de que já foi demonstrado, que macrófagos parasitados por *L.chagasi* por exemplo, possuem deficiência na produção de enzimas líticas como iNOS, ocorrendo também a redução

na capacidade de expressar moléculas de MHC classe II na membrana, isso auxilia o parasito a sobreviver nas células mononucleares e fagocíticas (Zafra et al., 2008 e Leão et al., 1995).

O aumento dos níveis séricos de nitratos foi, até certo ponto, surpreendente, uma vez que vários autores têm demonstrado que o NO, juntamente com o TNF- $\alpha$ , são as principais moléculas envolvidas na resistência a infecções por bactérias (*Mycobacterium tuberculosis* e *Salmonella spp.*), protozoários (*Leishmania major*, *Plasmodium chabaudi*, *Toxoplasma gondii*, e *Trypanosoma cruzi*) e helmintos (*Schistosoma mansoni*) (Woods et al., 1994; James, 1995). Sendo assim, a eficácia de alguns tratamentos na LVC estaria relacionada ao aparecimento de NO (Vouldoukis et al., 1996). Entretanto, em modelo experimental murino de infecção por *L. amazonensis*, foi demonstrado que o NO é de fato necessário, mas não suficiente para que o macrófago exerça sua atividade leishmanicida, uma vez que a adição de PGE<sub>2</sub> a culturas de macrófagos infectados aumenta a produção de NO, mas abole a atividade leishmanicida (Lonardoni et al., 2000).

Além disso, uma busca rápida em outras doenças causadas por protozoários indica que muitas das vezes o NO pode estar relacionado ao agravamento de infecções. Na infecção por *Trypanosoma brucei*, por exemplo, a inibição de NO reduz a parasitemia em camundongos, embora os resultados clínicos não tenham sido tão evidentes (Sternberg et al., 1994). Um outro exemplo é observado na infecção por *Plasmodium*, onde a inibição da síntese de NO pode amenizar conseqüências mais sérias como, por exemplo, a malária cerebral (Cox, 1997).

O agravamento de infecções pode estar relacionado ao efeito imunossupressor induzido pela produção excessiva e crônica de NO. Nascimento et al. (2002), por exemplo, demonstraram que o NO pode exercer um duplo papel em infecções, sugerindo que a sua produção é essencial para o controle de microorganismos, mas a sua produção elevada e constante pode tornar o indivíduo mais susceptível, um fenômeno que envolveria a inibição do TNF- $\alpha$  pelo NO.

Para investigar se o NO estaria de fato inibindo a produção de TNF- $\alpha$  pelos cães sintomáticos, foi investigada a presença dessa citocina no soro e nos sobrenadantes de culturas de linfonodo e baço. De fato, os níveis de TNF- $\alpha$  circulante foram inversamente proporcionais aos do NO. Embora este efeito não tenha sido tão evidente no linfonodo e baço, observou-se que os animais sintomáticos apresentaram uma redução significativa de TNF- $\alpha$

quando comparados aos cães assintomáticos. Estes resultados estão de acordo com Pinelli et al. (1994) que demonstraram que cães assintomáticos produzem concentrações aumentadas de IL-12 e TNF- $\alpha$  em comparação aos cães sintomáticos e aos não-infectados.

Os resultados obtidos na LVC parecem ser diferentes do que acontece em humanos. Alguns trabalhos sugerem que na LVA o aumento de TNF- $\alpha$  parece estar relacionado com a progressão da infecção. Gama et al. (2004) por exemplo, demonstraram que pacientes com formas subclínicas e clínicas de LVA apresentam TNF- $\alpha$  no soro, entretanto os níveis são maiores nos pacientes com infecção clínica. Da mesma forma, Pisa et al. (1990) demonstraram não haver relação entre altos níveis de TNF- $\alpha$  no soro e proteção a infecção.

O IFN- $\gamma$  assim como o TNF- $\alpha$ , tem sido muito estudado na leishmaniose por ser uma citocina fundamental na indução da ativação de macrófagos, células importantes no controle da infecção. Neste estudo, houve uma produção aumentada de IFN- $\gamma$ , a qual foi paralela a progressão da infecção. É interessante notar que houve uma relação direta entre a produção de IFN- $\gamma$  e a produção de NO, sugerido que, também na LVC, essa citocina está diretamente envolvida na indução da produção do NO. Estes dados estão de acordo com os achados de Caldas et al. (2005) que demonstraram que pacientes com LVA apresentam alta concentração de IFN- $\gamma$ , a qual é reduzida a medida que o tratamento com antimonialis é aplicado. Estes dados em conjunto nos levam a sugerir que elevadas concentrações de IFN- $\gamma$  estão associados ao agravamento da infecção, ainda que indiretamente, por induzirem a produção de altos níveis de NO.

Nossos resultados em conjunto apontam que a progressão da leishmaniose visceral canina está associada com altos níveis de óxido nítrico e interferon-gama e baixos níveis de fator de necrose tumoral. O aumento da produção de NO pode estar relacionado à progressão da LVC, por um mecanismo que envolve imunossupressão nos cães, diminuição da resposta inflamatória associada ao TNF- $\alpha$  e, conseqüentemente, proliferação do parasito.

## 8. CONCLUSÕES

- A localidade Vila Nova do Município de Raposa – MA, possui uma soroprevalência canina relativamente alta para leishmaniose sendo esta de 29,6%, o que confirma a área como endêmica para calazar.
- A porcentagem de cães machos infectados foi maior que de fêmeas nesta região
- A maioria dos cães participantes da pesquisa eram sintomáticos o que pode caracterizar uma infecção antiga e persistente na área.
- As subclasses de IgG (IgG1 e IgG2) neste estudo não se caracterizaram como bons marcadores da evolução da infecção por leishmaniose.
- A subclasse IgG2 apresentou correlação positiva com o número de sinais clínicos apresentados pelos cães, mas este resultado deve ser visto com cautela e associado a outros fatores.
- A progressão da leishmaniose visceral canina pode estar associada a produção de altas concentrações de óxido nítrico e interferon-gama e baixa produção de fator de necrose tumoral.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.M. Leishmaniose visceral canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. **Acta Med. Port.** v. 11, n. 10, p. 871-875, 1998.

ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.M.; RACHAMIN, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L.F.; JAFFE, C.L.L. 1991. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasit. Immunol.** v. 13, p. 537-550, 1991.

AHMADI, K., MCCRUDEN, A.B. Macrophage may responses to androgen via its receptor. **Med. Sci. Monit.**, v. 12, p. 15-20, 2006.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL, D.G. *Leishmania* species: models of Intracellular parasitism. **J. Cell. Sci.**, London, v. 112, p. 2993-3002, 1999.

ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUSA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A.; ATTA, A.M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 106, p. 151-158, 2005.

AMELA, C.; MENDEZ, I.; TORCAL, J.M.; MEDINA, G.; PACHÓN, I., CAÑAVATE, C.; ALVAR, J. Epidemiology of canine *leishmaniasis* in the Madrid region, Spain. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 11, n. 2, p. 157-61, Apr. 1995.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÍGUEZ F.; TESOURO M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

AWASTHI, A. MATHUR RK, SAHA B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian. J. Med. Res.**, v. 119, p. 238-258, June 2004.

AZEVEDO, J. P, BRITO, F.L.C, MAIA, F.C.L, CAVALCANTI, M.P, MORAIS, S.R.C , ALVES, L. C, FAUSTINO, M. A. G. Achados histopatológicos da pele de cães acometidos por leishmaniose visceral canina. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, Belo Horizonte, 2003.

BARCELOS, D.S. **Aspectos clínicos e parasitários de cães infectados naturalmente por *Leishmania* spp em duas áreas de transmissão intensa com diferentes características ambientais e sociais.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

BARRAL, A, BARRAL-NETTO M, YONG EC, BROWNELL CE, TWARDZIK DR, REED SG. Transforming growth factor  $\beta$  as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.90, p. 3442-3446, 1993.

BORIES, C.; SCHERMAN, E.; BORIES, P.N. Serum and tissue nitrate levels in murine visceral leishmaniasis correlate with parasite load but not with host protection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, p. 433-436, 1997.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunol.**, v. 14, n. 5, p. 531-9, 1992.

CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro – RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras.** 84 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)– Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

CABRERA, M.A.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.B.; MARZOCHI, M.C.A.; XAVIER, S.C.; SILVA, A.V.M.; JANSEN, A.M.A. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro Brazil: assessment of risk factors. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 45, p. 79-83, 2003.

CALDAS, A.; FAVALI, C.; AQUINO, D.; VINHAS, V.; VAN WEYENBERGH, J.; BRODSKY, C.; COSTA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Balance of IL-10 and Interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: Implications in the pathogenesis. **BMC Infect. Dis.**, v. 5, p. 113, 2005.

CALDAS, A.J.M.; SILVA, D.R.C.; PEREIRA, C.C.R.; NUNES, P.M.S.; SILVA, B.P.; SILVA, A.A.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luis – MA, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 445-451, 2001.

CAMPILLO, M.C., VAZQUEZ, F.A.R., FERNANDEZ, A.R.M., ACEDO, M.C.S., RODRIGUEZ,S.H., LOPEZ-COZAR, I.N., BAÑOS, P.D., ROMEROM H.Q., VARELA, M.C. (1999). **Parasitol. Vet.** 1ª ed. pp.651-665, 1999.

CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Cutaneous leishmaniasis. Unusual disease in Portugal? **Acta. Med. Port.** 15, 387-390, 2002.

CARVALHO, D.; OLIVEIRA, M.F.S.T.; BALDANI, D.C.; MACHADO, R.Z. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM antibodies against *Leishmania chagasi* in dogs. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 2, p. 120-124, 2009.

CERF, B.J.; JONES, T.C., BADARO, R.; SAMPAIO, D.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR., W.D. Malnutrition as a risk factor for severe visceral *leishmaniasis*. **J. Infect. Dis.**, v. 156, n. 6, p. 1030-3, 1987.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; CASTRO, G.O; FERREIRA, L.C. & ROMANA, C. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v.32, p. 321-385, 1937.

CHAGAS, E.; CUNHA. AM.; FERREIRA, L.C.; DEANE, L.M.; DEANE. G.; GUIMARÃES, F.N.; PAUMGARTEN, M.J.V. & SÁ, B. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1937. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v.33, p. 89-229, 1938.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K.P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (GP63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, n. 27, p. 43–52, 1988.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.103, p.67-75, 2005.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE L, SCALONE A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 141, p. 539-543, 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium*, v. 25, p. 358-68, 2003.

CORRALES, G.M., MORENO, R.M. Leishmaniosis canina: manejo clínico y situación actual en España. Espanha: **Quim. Farmac. Bayer**, 2006

COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; GONTIJO, N.F.; MICHALICK, M.S.M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, London, v.174, p.636-643, 2007.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCÉS, L.M.; SHAW, J.J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral Leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1314-1320, 2002.

COX, F.E.G. Designer vaccines for parasitic diseases. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, p. 1147-1157, 1997.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M.E. DE, BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 31, n. 140, p. 54-60, 2006.

DEBUS, A. High Levels of Susceptibility and T Helper 2 Response in MyD88-Deficient Mice Infected with *Leishmania major* Are Interleukin-4 Dependent. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 12, p. 7215–7218, Dec. 2003

DE LUNA, R.; VUOTTO, M.L.; IELPO, M.T.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; MOSCATIELLO, V.; CIARAMELLA, P.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; MANCINO, D.

Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Vet.Immunol. immunopathol.**, v. 70, p. 95-103, 1999.

DE PAULA, A.A.; DA SILVA, A.V.M.; FERNANDES, O.; JANSEN, A.M. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. **J. Parasitol.**, v. 89, Suppl 4, p. 832-6, 2003.

DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol.**, v. 17, p. 451-458, 1995.

DIAS, E.L.; BATISTA, Z.S.; GUERRA, R.M.S.N.C.; CALABRESE, K.S.; LIMA, T.B.; ABREU-SILVA; A.L. Canine Visceral Leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão State, Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 740-745, 2008.

DIETZE, R. BARROS GB, TEIXEIRA L, HARRIS J, MICHELSON K, FALQUETO A, COREY R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin Infect Dis.**, v. 25, p. 1240-2, 1997.

ETGES, R.; MULLER, I. Progressive disease or protective immunity to *Leishmania major* infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions. **J. Mol. Med.**, v. 76, p. 372-390, 1998.

FEITOSA M.M.; IKEDA F.A.; LUVIZOTTO, M.V.R.; PERRI S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clin. Vet.**, v. 5, n. 28, p.36-44, 2000.

FERRER, L. Leishmaniosis update in diagnosis and therapy. **Proceedings of the 14th Annual Congress ESVD-ECVD PISA**, p. 33-36, 1997.

FERRER, L. M. The pathology of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2, 2002, Sevilha. **Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum**. Sevilha: [s.n.], p. 21-24, 2002.

FISA, R.; GÁLLEGO, M.; CASTILLEJO, S.; AISA, M. J.; SERRA, T.; RIERA, C.; CARRIÓ, J.; GÁLLEGO, J.; PORTÚS, M. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) The example of Priorat focus. **Vet. Parasitol.**, v. 83, p. 87-97, 1999.

FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.C.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 111, p. 161-173, 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Leishmaniose visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Uberaba, ano 2, n. 6, 2002. Disponível em:<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano02\\_n06\\_lv\\_sit\\_epid\\_br.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano02_n06_lv_sit_epid_br.pdf)>. Acesso em: 14 jan. 2011.

GALIMBERTTI, M.Z.; KATZ, G.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RODAS, L.A.C.; CASANOVA, C.; COSTA, A.I.; ARAUJO, M.F.L.; TANIGUCHI, H.H.; BARBOSA, J.A.R.; BARBOSA, J.E.R.; TOLEZANO, J.E.; PINTO, P.L.S. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 217, 1999.

GAMA, M. E.; COSTA, J. M.; PEREIRA, J. C.; GOMES, C. M.; CORBETT, C.E. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 129-136, 2004.

GARCIA, A.M. **Estudo da infecção e doença no cão (*Canis familiaris*) *Leishmania (Leishmania) chagasi* em uma área endêmica na ilha de São Luís-Maranhão, Brasil.** 2004. 101f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2004.

GASKIN, A.A.; SCHANTZ, P.; JACKSON, J.; BIRKENHEUER, A.; TOMLINSON, L.; GRAMICCIA, M., LEVY, M.; STEURER, F.; KOLLMAR, E.; HEGARTY, B.C.; AHN, A.; BREITSCHWERDT, E.B. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 16, n. 1, p. 34-44, Jan-Feb. 2002.

GONÇALVES R; TAFURI WL; MELO MN; RASO P; TAFURI W.L. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*-

histopathological and morphometrical study. **Ver. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 45, p. 1–12, 2003.

GHOSH, J., DAS, J., MANNA, P., SIL, P.C. Cytoprotective effect of arjunolic acid in response to sodium fluoride mediated oxidative stress and cell death via necrotic pathway. **Toxicol.** 22, 1918–1926, 2008.

GRADONI, L.; MAROLI, M.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. **Med. Vet. Entomol.**, v. 1, p. 339-42, 1987.

GRADONI, L. Treatment of Mediterranean visceral Leishmaniasis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 73, n. 2, p. 191-197, 1995.

GUERRA, J.A.O., BARROS, M.L.B., FÉ, N.F., GUERRA, M.V.F., CASTELLON, E., PAES, M.G., SHERLOCK, I.A. Leishmaniose visceral entre índios no estado de Roraima Brasil: aspectos clínico-epidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, p. 305–311, 2004.

GUIMARÃES, K.S.; BATISTA, Z.S.; DIAS, E.L.; GUERRA, R.M.S.N.C.; COSTA, A.D.C.; OLIVEIRA, A.S.; CALABRESE, K.S.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.S.S.; ZAVERUCHA DO VALE, T.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; ABREU-SILVA, A.L. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 131, p. 305-309, 2005.

HALL, L.R.; TITUS, R.G. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. **J. Immunol.**, v. 155, n. 7, p. 3501-3506, 1995.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Adv. Parasitol.**, v. 44, p. 1-39, 1999.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **The Lancet**, Atlanta, v. 354(9185), p.1191–1199, 1999.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Dados e mapas das cidades brasileiras**. Brasil, 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>. Acesso em: 15 jan. 2011.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Ver.**, v. 59, p.533–547, 1995.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, v. 290, n. 5495, p. 1351-4, 17 nov. 2000.

KILLICK-KENDRICK R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, 65 (Suppl), p. 37-42, 1990.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. Old World Canine Leishmaniasis. **Comp. Cout. Ed. Small Animal**, v. 15, n. 7, p. 949-959, 1993.

LAGE, R.S.; OLIVEIRA, G.C.; BUSEK, S.U.; GUERRA, L.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B.; GIUNCHETTI, R.C. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi* . **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.115, p. 135-45, 2006.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**, v. 1, 1. ed. Londres: Academic Press, cap. 7, p. 291-364, 1987.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. **A Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LARANGEIRA, D.F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor**. 2008. 79f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2008.

LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F.; PARRA-LOPEZ, C.; LOUIS, J.A. Cytokines in parasite diseases: the example of cutaneous leishmaniasis. **Int. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 157-180, 1998.

LEÃO, S. S.; LANG, F.; PRINA, E.; HELLIO, R.; ANTOINE, J.C. Intracellular *Leishmania Amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **J. Cell Science**, Washington, n. 108, p. 3219-3231, 1995.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ROMÃO, P.; CORTES, S.; ROLAO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; RICA-CAPELA, M.J.; ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 79, p. 273-284, 2001.

LIEW, F.Y.; XU, D.M.; CHAN, W.L. Immune effector mechanism in parasitic infections. **Immunol. Let.**, v. 65, p. 101-104, 1999.

LIMA, W.G., MICHALICK, M.S.M., MELO, M.N., TAFURI, W.L., TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 92, p. 43-53, 2004.

LIMA, V.M.F.; PEIRO, J.R.; VASCONCELOS, R.O. IL-6 and TNF - production during active canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 2006.

LINS, B. T. Síndrome vestibulo-cerebelar associada à leishmaniose visceral em cão: Relato de caso. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 2003, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2003.

LUVIZOTTO, M.C.R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. **Anais do 1º Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina**. Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal(SP), 2006.

LIU, L.; BENTEN, W.P.; WANG, L.; HAO, X.; LI, Q.; ZHANG, H.; GUO, D.; WANG, Y.; WUNDERLICH, F.; QIAO, Z. Modulation of *Leishmania donovani* infection and cell viability by testosterone in bone marrow-derived macrophages: signaling via surface binding sites. **Steroids.**, v. 70, p. 604-14, 2005.

LONARDONI, M.V.C.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infect. Immunity.**, v. 68, p. 6355-6361, 2000.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 566-567, 1988.

MANNA, L.; REALE, S., VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V.F.; MICHELE, P.L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A.E. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet.Parasito.** v. 142, p. 271-280, 2006.

MANNA L, GRAVINO AE, PICILLO E, DECARO N, Buonavoglia C. Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. **Ann N Y Acad Sci**, 2008.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PICILLO, E.; PAVONE, L.M.; GRAVINO, A.E. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet. J.**, v. 177, n. 2, p. 279-82, Aug. 2008.

MANNA, LAURA; REALE, STEFANO; VITALE, FABRIZIO; GRAVINO, ANGELO ELIO. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res. Vet. Science**, v. 87, n. 1, p. 76-78, Aug. 2009.

MARGONARI, C.; FREITAS, C.R.; RIBEIRO, R.C.; MOURA, A.C.M.; TIMBÓ, M.; GRIPP, A.H.; PESSANHA, J.P.; DIAS, E.S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 31-38, 2006.

MAROLI, M.; PENNISI, M. G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRANDONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, v. 145, p. 357-360, 2007.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; HERNÁNDEZ, S. Humoral and cell – mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 48, p. 209-220, 1995.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; SOUZA, P. P.; TOLEDO, L. M.; FILHO, F. B. R. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MELO, F.A.; PEREIRA, J.G.; CALABRESE, K.S.; ABREU-SILVA, A.L. Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis and Chagas disease in Vila São José - São José de Ribamar. Maranhão State. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 12, p. 130, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde - Brasil. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Brasília, 126p, 2006.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide: Biol. and Chem.**, v. 5, p. 62-71, 2001.

MIRANDA, S. Clinically patent canine leishmaniasis shows age, breed and sex predilection. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 3., 2005, Palermo. **Anais** Palermo: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Istituto Superiore Di Sanita and Turkish Society for Parasitology, p. 171, 2005.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDREAS, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v 88, p. 491-493, 1994.

MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; LINS, G.L.; COELHO, M.; ROCHA, M.F.; DIAS, C.L.F.; DIAS, E.S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Salvador, v. 38, n. 2, p. 147- 152, 2005.

MONTEIRO, A.R.P. **Estudo epidemiológico da Leishmaniose Canina na Zona da Arrábida.** Dissertação (Mestrado). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal, 2010.

MORENO, E. C. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Rev. Soc. Br. Med. Trop.** v. 38, n. 6, p. 456-463, nov-dez. 2005.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.**, vol. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MURRAY, W.H.; NATHAN, F.C. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 741-746, 1999.

NASCIMENTO, F.R.F.; CALICH, V.L.G.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: Essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4593-4600, 2002.

NIETO, C.G.; GARCÍA-ALONSO, M.; REQUENA, J.M.; MIRÓN, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 67, p. 117-130, 1999.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; NUNES, D.B.; ZINEZZI, R.O.; SAVANI, E.S.M.M.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M.C.G.O.; D'ÁURIA, S.R.N.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 3, 2001.

OLSEN, N.L.; KOVACS, W.J. Gonadal steroids and immunity. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 17, 369, 1996.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.A.R.; SANTOS, W.C.; GRIMALDI JR., G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. A. Cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 1, p. 39-44, 1996.

PINELLI, E. R KILLICK-KENDRICK, J WAGENAAR, W BERNADINA, G DEL REAL, AND J RUITENBERG, Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E; GONZALO., R,M; BOOG, J.P.C; RUTTEN, V.P.M.G., GEBHARD, D.,GUSTAVO DEL R., RUITENBERG E. J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v.25, p.1594-1600, 1995.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.M.G.; RUITENBERG, E.J. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings**. Barcelona, p. 60-4, 1999a.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; VAN HOEIJ M.; LANGERMANS, J.A.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet. Parasitol.**, v. 92, p. 181-189, 2000.

PISA, P. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 161, n. 5, p. 988-91, May 1990.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, P.M.; KAYE, P.M.; SHAW, M.A.; DYE, C.; DAY, M.J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 91, p. 161–168, 2003.

RAFATI, S.; NAKHAE, A.; TAHERI, T.; TASLIMI, Y.; DARABI, H.; ERAVANI, D.; SANOS, S.; KAYEC, P.; MOHAMMAD, T.; JAMSHIDI, S.; ALI, M.R. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. **Vaccine**, v. 23, p. 3716–3725, 2005.

RATH, S. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 112 (3-4), 102-116, 2006.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORRÊA OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Science**, v. 81, p. 68-75, 2006a

REIS, A. B. FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORRÊA OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, p. 87-95, 2009.

RIBEIRO, V. M.; RAJÃO, R. A.; DE ARAÚJO DINIZ, S.; MICHALICK, M. S. M. Evaluation of the potential transmission of visceral leishmaniasis in a canine shelter. **Rev. Med. Vet.**, v. 156, n. 1, p. 20-22, 2005.

RIGO, R.S.; RIGO, L.; HONER, M.R. Aspectos Clínicos e Laboratoriais na Leishmaniose Visceral Americana. **J. Bras. Nefrol.**, v. 31, n. 1, p. 48-54, 2009.

ROGERS, S.A.; HAMMERMAN, M.R. Epidermal growth factor binding and stimulation of inositol trisphosphate production in basolateral membranes from dog kidney. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 191, n. 3, p. 1319-1325, Mar. 1993.

SACKS, D.L. An analysis of T cell responsiveness in Indian Kala-azar. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 138, p. 908 – 913, 1987.

SACKS D.; KAMHAWI S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 453-83, 2001.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immun. Immunopathol.**88, 21-30, 2002.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral Leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.**, v. 12, p. 315-317, 1998.

SCOTT, P.; ARTIS, D.; UZONNA, J.; ZAPH, C. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. **Immun. Rev.**, v. 201, p. 318-338, 2004.

SHERLOCK IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 91, p. 671-83, 1996.

SHIDDO, S.A. Visceral leishmaniasis in Somalia: prevalence of markers of infection and disease manifestation in a village in an endemic area. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 89, p. 361-365, 1995.

SIMÕES-MATOS, L.; MATTOS, M. R. F.; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA-LIMA, J. W.; BEVILAQUA, C. M. L.; PRATA-JÚNIOR, R. C.; HOLANDA, C. M.; RONDON, F. C. M.; BASTOS, K. M. S.; COELHO, Z. C. B.; COELHO, I. C. B.; BARRAL, A.; POMPEU, M. M. L. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Vet. Parasitol.**, v. 127: 199-208, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGO, M.; VALLADARES, J.E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Vet. Parasitol.**, v. 96, p. 265–276, 2001.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. **Adv. Immunol.**, v. 74, p. 275-317, 2000.

STERNBERG, J.; MABBOTT, N.; SUTHERLAND, I.; LIEW, F.Y. Inhibition of nitric oxide synthesis leads to reduced parasitemia in murine *Trypanosoma brucei* infection. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 2135-2137, 1994 .

SZETO, HAZEL H. Mitochondria-Targeted Peptide Antioxidants: Novel Neuroprotective Agents. **The A.A.P.S. Journal**, v. 8, n. 3, 18 Aug. 2006. Disponível em: <<http://www.aapsj.org>>. Acesso em: 20 jan. 2011.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral *leishmaniasis*: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 3, p. 287-92, 1995.

VAN DER MEIDE, W.F.; SCHOONE, G.J.; FABER, W.R.; ZEEGELAAR, J.E.; DE VRIES, H.J.; OZBEL, Y.; LAI A FAT, R.F.; COELHO, L.I.; KASSI, M.; SCHALLIG, H.D. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5560–5566, 2005.

VERÇOSA, B.L. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Vet. Res.**, v. 4, p. 1-7, 2008.

VOULDOUKIS, I.; DRAPIER, J.C.; NUSSLER, A.K.; TSELENTIS, Y.; SILVA, O.A.; GENTILINI, M.; MOSSALAYI, D.M.; MONJOUR, L.; DUGAS, B. Canine visceral *leishmaniasis*: successful chemotherapy induces macrophages antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, p. 253-256, 1996.

ZAFRA, R.; JABER, J. R.; PEREZ-ECIJA, R. A.; BARRAGAN, A.; MARTINEZMORENO, A.; PEREZ, J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 123, p. 353-359, 2008.

WOOD, D.E.; PALMER, J.; MISSETT, P.; WHITBY, J.L. Proficiency testing in parasitology. An educational tool to improve laboratory performance. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 102, n. 4, p. 490-4, 1994.

YAO, C., DONELSON, J.E., WILSON, M.E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis regulation of expression and function. **Mol. Biochem. Parasitol.** 132, 1–16, 2003.

## *CAPÍTULO II*

## 1. INTRODUÇÃO

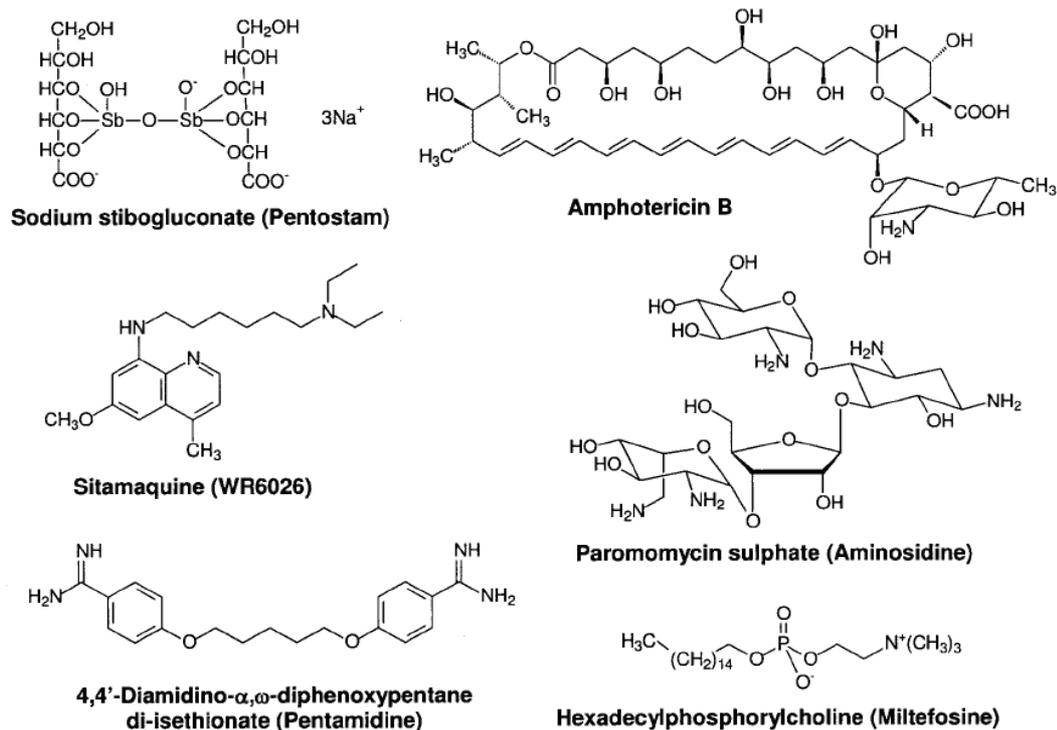
### 1.1 Tratamentos para Leishmaniose Visceral Canina

O desencadeamento e controle da LVC depende de muitos fatores e representa um sério problema, uma vez que, tanto os cães assintomáticos como sintomáticos podem ser reservatórios, o que limita inclusive a eficácia das drogas leishmanicidas usuais (Herwaldt, 1999; Gradoni et al., 1987; Molina et al., 1994).

O tratamento da LVC não é recomendado pelo Ministério da Saúde e no Brasil já existe uma portaria interministerial de número 1.426, de 11 de julho de 2008, que "... proíbe o tratamento da LVC com produtos de uso humano ou registrados no MAPA" Baneth et al. (2002); Greene, (2006) relataram que a leishmaniose canina é mais resistente a terapia que a leishmaniose humana e em geral os parasitos não são completamente eliminados pelos fármacos utilizados.

As drogas utilizadas principalmente em países europeus, para o tratamento da LVC são os Antimoniais, o Desoxicolato de Anfotericina B (Anfotericina B) convencional ou encapsulada em lipossomas, o Sulfato de Aminosidina (Aminosidina), o Alopurinol, a Pentamidina e, recentemente, o Éster de fosfatidilcolina do hexadecanol (Miltefosina) (Alvar et al., 2004; Miró, 2005; Nieto et al., 2005). O uso destas drogas associadas, como os Antimoniais e Alopurinol, pode potencializar a eficácia do tratamento, bem como possivelmente limitar a resistência do parasito as drogas . No Brasil o uso de antimoniato de n-metilglucamina é apenas para tratamento humano, para evitar resistência aos parasitos.

A Anfotericina B, droga fungicida, é considerada fármaco de segunda escolha para o tratamento da LVC, é um antibiótico da classe dos polienios obtido a partir do *Streptomyces nodosus*. Possui atividade contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Leishmania* spp. (Lemke et al., 2005; Baneth, 2006) e atua rompendo a membrana celular via ligação com o ergosterol causando desorganização estrutural e alteração na permeabilidade da mesma, provocando assim a morte do parasito. O tratamento com essa droga tem alcançado mais de 70% de cura clínica, redução nas sorologias positivas e normalização da relação albumina/globulina (Lamothe, 1997).



**Figura 1.** Esquema estrutural das principais drogas utilizadas para tratamento das leishmanioses. Fonte: Croft et al., 2006

O Alopurinol, um outro fármaco bastante citado nos estudos sobre terapêutica para LVC, é um análogo de purina com atividade leishmanioestática. Nesse caso, ocorre uma metabolização pelo parasito para produzir um análogo de inosina, sendo incorporado ao ácido ribonucleico da *Leishmania*, provocando alterações na tradução protéica e inibição da multiplicação do parasita (Greene, 2006).

Dentre os poucos efeitos colaterais apresentados durante a administração desta droga, está a hipoxantinúria, que pode provocar urolitíases (Ginel et al, 1998). Entretanto, vários relatos apontam a presença de parasitos na medula óssea e em outros órgãos de cães assintomáticos anos após o tratamento. A remissão clínica é freqüentemente obtida com a dose diária de 20 mg/kg entre quatro semanas. Entretanto, a reincidência ocorre uma vez cessada a terapia e mesmo com a administração da droga durante 6 meses, a recuperação completa não é mostrada (Lester et al., 1996).

A Miltefosina que age no metabolismo lipídico e na membrana, um dos mais recentes fármacos estudado para o controle da leishmaniose canina, só atua na replicação das *Leishmanias*, mas não impede a disseminação e permanência dos parasitos nos órgãos linfóides, apesar destes não serem detectados no sangue, contribuindo para os casos de recidivas (Nieto et al., 2005 e Manna et al, 2008).

Manna et al (2008), demonstraram utilizando a técnica de Real Time PCR, redução na carga parasitária em cães que foram tratados com uma combinação de Miltefosina e Alopurinol, porém alguns destes cães apresentaram recidiva seis meses após o tratamento.

Uma estratégia utilizada, porém como medida profilática da LVC, vem sendo o desenvolvimento de vacinas. No país já foi registrada e liberada para uso pelo MAPA a Leishmune® , composta por antígenos complexos glicoprotéicos ligantes de fucose e manose (FML) de *L. donovani* e saponina (adjuvante). É indicado para cães a partir de quatro meses de idade e consiste de três doses com intervalo de 21 dias com reforço anual a partir da primeira aplicação (Ribeiro, 2005) .

Apesar dos avanços Ferrer em 1997 já afirmava que dificilmente a *Leishmania* será eliminada do cão e que os tratamentos reduzem a carga parasitária e os sinais clínicos, estimulando a resposta celular para controlar a doença.

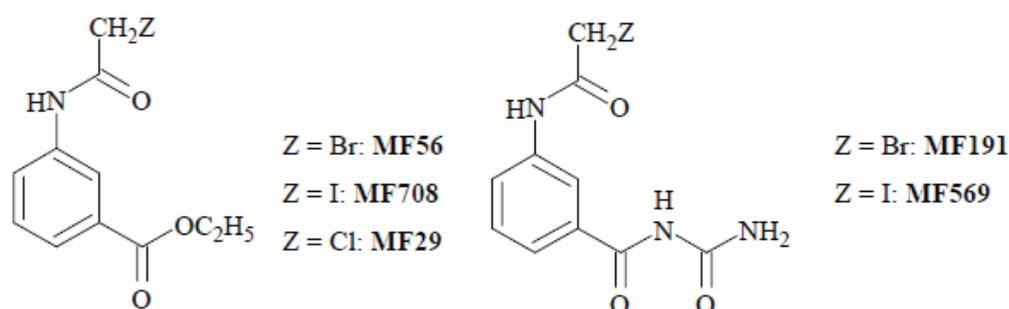
## 2. JUSTIFICATIVA

Em áreas consideradas endêmicas para LV a principal estratégia utilizada pelos órgãos públicos para controle da infecção é a eliminação dos reservatórios, através da eutanásia dos soropositivos e com sinais clínicos evidentes. Isso reforça a indicação de que o tratamento destes animais não é recomendando e que a administração de drogas leishmancidas que constam no MAPA é proibida. Essa estratégia no entanto, a muitos anos apresenta falhas e resultados controversos, apontando a necessidade de se estudar melhor o papel do cão como provável responsável pela manutenção da infecção nestas regiões.

Uma alternativa para reduzir o insucesso no controle da LVC seria o teste com novos quimioterápicos que possam agir reduzindo de maneira significativa a carga parasitária nos cães infectados, de forma que estes deixem de ser potenciais reservatórios e transmissores do parasito.

O tratamento com as drogas de primeira como antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metil glucamina-Glucantime® e estibogluconato de sódio-Pentostan®, apesar de apresentarem efeitos satisfatórios em cães doentes, torna-se inviável por necessitar de longos períodos de administração, aumentando o custo do tratamento, bem como efeitos adversos nos animais. A principal problemática do tratamento da LVC com essas drogas é o desenvolvimento de resistência dos parasitos.

Diante disto, nesta pesquisa propomos a quimioterapia de animais infectados, com uma nova droga denominada Haloacetamido (Figura 2), não utilizada para tratamento de casos humanos e com excelentes resultados leishmanicidas *in vitro*, conforme mostra a Tabela1.



**Figura 2.** Estrutura de MF56, MF708, MF29, MF191 e MF569. Fonte: Hiam et al, 2006

O Haloacetamido é uma droga promissora derivada da família dos haloacetamidobenzóicos. Hiam et al (2006) demonstraram que esta droga, dentre os compostos estudados, apresentou uma alta *atividade in vitro* contra três espécies de *Leishmanias*, com valores de  $IC_{50}$  inferiores a  $1,8 \mu\text{M}$ , sendo o mais eficaz contra a espécie *L. infantum*.

No mesmo estudo foi mostrada atividade *in vivo* do Haloacetamido, reduzindo a carga parasitária no fígado, baço e linfonodo, após administração intraperitoneal de  $10\text{mg/kg}$  durante 10 dias consecutivos em camundongos Balb/c em comparação aos animais tratados subcutaneamente com antimoniato de meglumina. Existem evidências, que esse potencial fármaco parece alterar a estrutura dos microtúbulos dos parasitos, mais precisamente a classe de microtúbulos associadas as proteínas MAP2. Esses microtúbulos estão ligados a locomoção e processos de divisão celular do parasito, sendo portanto um excelente alvo de estudo.

**Tabela 1: Suscetibilidade (IC<sub>50</sub>=μM) de espécies de *Leishmania* aos derivados de ácido 3-haloacetamidobenzoico. Fonte: Hiam et al, 2006**

Derivados	Promastigotas			Amastigostas
	<i>L.mexicana</i>	<i>L.major</i>	<i>L.infantum</i>	<i>L.mexicana</i>
MF 191	1.8 ± 0.2	9.1 ± 0.7	148.5 ± 9.6	0.3 ± 0.0
MF 569	1.6 ± 0.4	ND	21.1 ± 4	1.2 ± 0.3
MF 708	1.2 ± 0.3	ND	17.0 ± 4	0.6 ± 0.2
MF 56	1.6 ± 0.1	ND	8.6 ± 2	0.1 ± 0.0
MF 29	0.3 ± 0.1	1.8 ± 0.3	0.9 ± 0.4	0.3 ± 0.0
Taxol	43.4	ND	ND	0.90
Vinblastina	96.5	ND	ND	ND
GLUC	11700 ± 1.2	ND	ND	133 ± 23

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Gerais

Testar a eficácia do tratamento com Haloacetamido em cães infectados com *L.chagasi*.

#### 3.2. Específicos

- Comparar clinicamente os cães infectados com *L.chagasi* tratados com Haloacetamido com animais que receberam Alopurinol ( tratamento convencional utilizado para LVC).
- Quantificar a carga parasitária dos animais antes e depois dos tratamentos por pcr em tempo real.
- Avaliar marcadores bioquímicos de função hepática e renal nos cães durante o tratamento
- Quantificar as concentrações séricas da enzima Superóxido Dismutase nos animais tratados
- Avaliar aspectos ultrassonográficos dos cães em tratamento
- Comparar, utilizando a técnica de imunohistoquímica, o número de macrófagos infectados nos cães tratados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

O estudo incluiu 20 cães da raça Beagle com idades entre 1-2 anos, expostos por aproximadamente sete meses a infecção, em uma área endêmica para leishmaniose visceral canina na localidade de São Raimundo ( 2° 34'S e 44°09'W), Ilha de São Luís-Maranhão. Essa região pertence a um dos sete distritos que compõem o município. Os cães foram diagnosticados com LV através de exame sorológico e do ensaio de PCR em tempo real realizado a partir da punção de linfonodo poplíteo. Os proprietários dos cães positivos foram informados sobre o resultados dos exames e os dados obtidos foram informados ao Centro de Zoonoses de Sao Luís-MA. Os cães foram recolhidos e nesse momento o proprietário assinou um termo de Conhecimento Livre e Esclarecido, doando seu cão para a pesquisa( Comitê de ética: Fundação Oswaldo Cruz - registro de número 002/2005).



**Figura 3. Mapa da Ilha de São Luís-MA, com a localização do São Raimundo, região pertencente ao Distrito Tirirical.**

Antes do início dos tratamentos, foi realizada avaliação clínica dos animais, na qual foram atribuídos escores de 0 a 10 de acordo com a presença e gravidade dos sinais clínicos, incluindo: tamanho do linfonodo poplíteo, comprometimento da pele, alteração no peso corporal, presença de lesões oculares, entre outros conforme descrito por Manna, et al (2009).

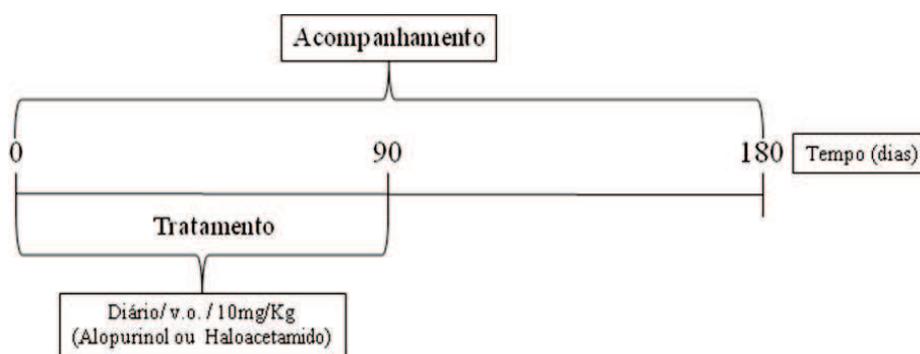


**Figura 4. Sinais clínicos em animais infectados por *L.chagasi*.** A, B- animais assintomáticos, C- perda de peso e alopecia, D- uveíte, E- onicogribose, F- lesão de pele.

Os parâmetros bioquímicos como: uréia, proteínas torais, triglicerídeos, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fostatase alcalina também foram mensurados em todos os cães. As avaliações clínicas, o acompanhamento dos parâmetros bioquímicos, bem como punção de linfonodo poplíteo, ultrasonografia abdominal e coleta de sangue periférico, foram realizados periodicamente durante todo o tratamento e após suspensão do mesmo em todos os cães, com a supervisão técnica de um médico veterinário.

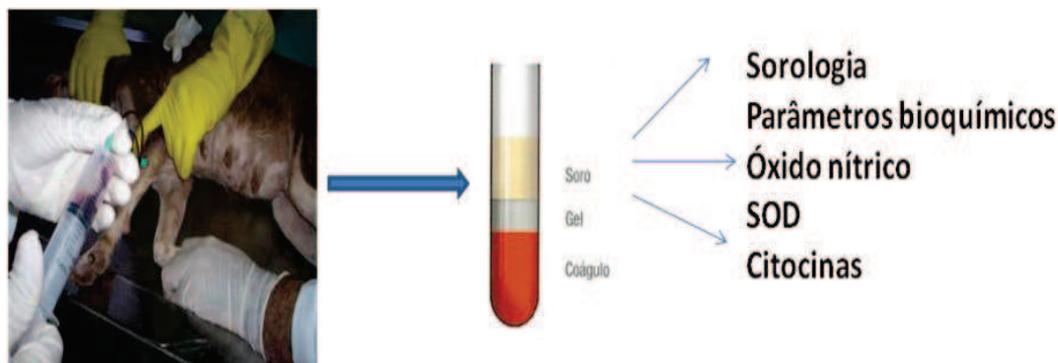
Os cães foram distribuídos em dois grupos com 10 animais/grupo, um recebeu Alopurinol (10mg/Kg) e o outro recebeu Haloacetamido (10 mg/kg), ambos por via oral durante noventa dias consecutivos. Após esse período, o tratamento foi suspenso e cinco animais de cada grupo foram acompanhados por mais noventa dias. Foram coletas amostras de tecidos após o término do tratamento, para realização de imunohistoquímica.

#### Esquema de tratamento com as drogas



#### 4.2. Amostras

As amostras de sangue de cada animal foram colhidas por punção venosa periférica, em frascos com ou sem anticoagulante (EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético), para realização dos testes bioquímicos e sorológicos. O soro foi obtido após centrifugação destas amostras a 3000 rpm por 10 minutos. Após a separação do soro, o mesmo foi dividido em alíquotas de um mililitros em tubos de microcentrífuga de 1,5mL de capacidade, que foram congeladas a -20°C até o momento da execução dos testes. A avaliação dos parâmetros bioquímicos foi realizada conforme protocolo do Kit de diagnóstico padrão da Labtest®.



**Figura 5. Obtenção de amostras de sangue em animais infectados por *L.chagasi*.**

Após anestesia o aspirado obtido por punção do linfonodo poplíteo foi adicionado ao tampão (0,15M NaCL; 50nM EDTA; 0,1M de Tris-HCL) e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  .

#### **4.3. Extração de DNA das amostras**

Após descongelamento, foi adicionado as amostras  $400\mu\text{L}$  de fenol, os tubos foram gentilmente invertidos, em seguida centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos. Após obtenção da fase aquosa, a mesma foi transferida para outro tubo e acrescida de  $200\mu\text{L}$  clorofórmio e  $200\mu\text{L}$  de álcool isoamílico, a solução obtida foi homogeneizada e centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e novamente homogeneizados e centrifugados com  $400\mu\text{L}$  de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico. O material foi centrifugado a temperatura ambiente a 12.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo microtubo. Adicionou-se  $40\mu\text{L}$  de acetato de sódio 3M e completou-se o volume até 1, 5ml com etanol absoluto gelado. Os tubos foram invertidos e após terem sido incubados a  $4^{\circ}\text{C}$  overnight, foram centrifugados a 13000 rpm por 8 minutos e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram lavados com etanol gelado a 70%. Os sobrenadantes foram descartados e o DNA foi seco a temperatura ambiente por 10 minutos. Após a secagem, o DNA foi eluído em  $50\mu\text{L}$  de água estéril e estocado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4. Seleção dos primers e realização do real-time PCR**

Para determinação da carga parasitária nos linfonodos, 50ng de DNA de cada amostra foi usada para quantificação por PCR em tempo real. As amostras foram amplificadas com auxílio do ABI Prism 7500 Sequence Detection System usando o SYBER-Green PCR master mix kit (Applied Biosystems) e 250 nM de oligonucleotídeos internos. Os *primers* utilizados nas reações de amplificação foram desenhados pelo programa Primer Express (Applied Biosystems, EUA) Rev: 5'-CCA CCG GTC GTTGTGATG -3' e Fwd: 5'-CCC GAG GGC AGC ACT TG -3', sequências do cinetoplasto do DNA da *Leishmania*. As condições iniciais consistiram na pré-incubação a 95°C por 10 min, seguido por amplificação do DNA alvo por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C for 10 min e 1 minuto a 60°C com o ABI Prism 7500 Sequence Detection System de acordo com especificações do fabricante. As amostras foram amplificadas em placas de 96 poços. Para cada placa e corrida realizada foi sempre incluído controle negativo. Foi utilizada uma curva padrão com nove concentrações diferentes de DNA de *L. chagasi*.

#### **4.5. ELISA para detecção de citocinas**

A presença das citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  foi quantificada no soro, pelo método de ELISA de acordo com as especificações do Kit R&D Systems Cat.Nº CAIF00 (Minneapolis, USA).

#### **4.6. Imunohistoquímica**

As lâminas, contendo cortes parafinados de tecidos, foram desparafinadas em xilol por 10 minutos por 2 vezes, hidratadas em solução de álcoois decrescentes (álcool absoluto, 70%, 50%, 30% e 15% respectivamente) e submetidas a um banho em PBS Solução de Tampão Fosfato - pH 7,2, 0,01M). Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena adicionando-se ao banho de PBS, peróxido de hidrogênio 3%, por 30min à

temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com solução de bloqueio com leite (3% em PBS) e incubadas em câmara úmida por 30 min à temperatura ambiente. Logo após, o anticorpo primário (soro de coelho infectado com *L. chagasi*, na diluição de 1/1000 em Dako antibody diluent ref:s3022) foi adicionado em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas por 24 horas em câmara úmida a 4°C. Adicionou-se então o anticorpo secundário biotilado na diluição de 1/100 (DAKO- LSAB 2 System, Peroxidase- k4068 ), sendo as lâminas novamente incubadas em câmara úmida por 30min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se o complexo estreptoavidina peroxidase (cat k4068), e incubou-se por 30min em câmara úmida à temperatura ambiente. A reação foi revelada com kit DAKO cat 3468 , por 5min à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em água corrente e foi realizada uma contracoloração com Hematoxilina de Mayer. As lâminas foram desidratadas em álcoois crescentes, diafanizadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio ótico de luz comum através da contagem de cinco campos por dois patologistas diferentes em objetiva de 40x.Foi considerada a média das contagens de cinco lâminas por grupo.

#### **4.7. Ultrassonografia**

Os cães foram contidos e os órgãos abdominais avaliados com o uso do aparelho de ultrassonografia portátil da marca Honda - Ultrasonic scanner - Modelo: HS-2000 - SN:22010999. - Sonda - 7.5 MhZ, quanto à dimensão, ecotextura e arquitetura.

#### **4.8. Superóxido Dismutase**

Foi quantificada a produção de superóxido dismutase no soro de todos os cães, conforme protocolo do Kit da Calbiochem / Superoxide Dismutase Assay Kit II Cat. No. 574601.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.) utilizando o teste T de Student. Para análise dos dados da imunohistoquímica foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Em todos os casos os resultados foram considerados significantes quando,  $p \leq 0.05$ . Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão dos grupos tratados em relação ao controle, conforme o caso.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Parâmetros Bioquímicos

As análises bioquímicas, para avaliar principalmente as funções hepática e renal, não mostraram diferenças significativas quanto aos valores de proteínas totais, triglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina, embora as concentrações de uréia estivessem reduzidas no 90º dia de tratamento com Alopurinol, permaneceram entre os valores de referências normais nos períodos pós tratamento nos dois grupos tratados (Tabela 2).

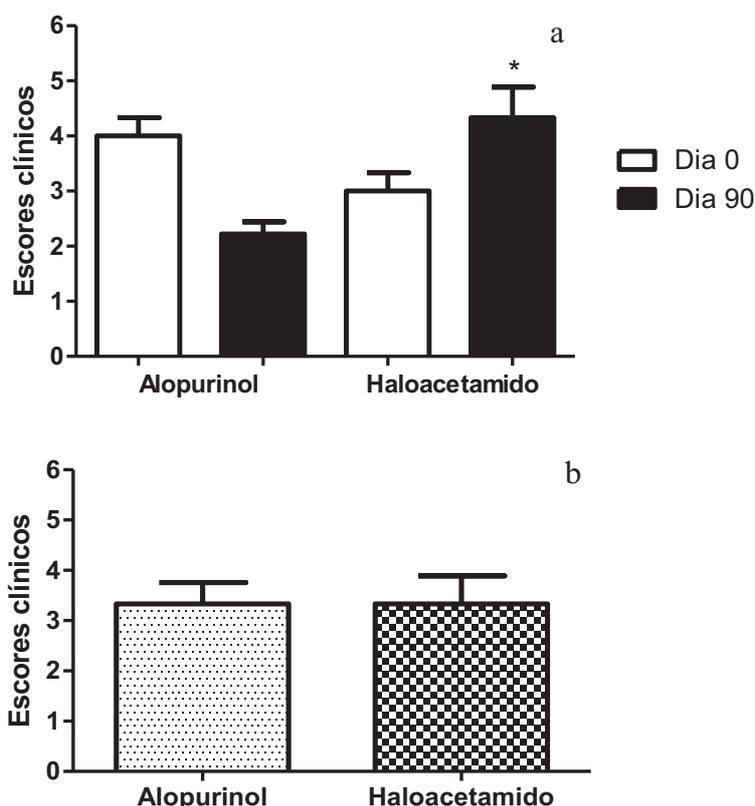
**Tabela 2. Avaliação de parâmetros bioquímicos em cães infectados por *L. chagasi* (média±SE).**

	Dia 0		Dia 90	
	Alopurinol	Haloacetamido	Alopurinol	Haloacetamido
Uréia (mg/dL)	41.12±5.18	37.97±6.57	22.13±12.88*	29.69±3.29
AST (U/L)	62.00±14.31	73.88±8.74	50.75±12.45	77.31±12.89
ALT (U/L)	63.92±9.35	51.85±4.81	45.57±11.56	28.05±7.21
FA (U/dL)	33.88±18.19	22.55±11.37	60.04±4.12	45.12±11.53
PT (g/dL)	8.49±0.78	7.00±1.16	7.60±0.87	7.40±0.53
TG (mg/dL)	45.02±9.65	41.81±6.26	34.25±10.15	30.49±9.15

\*p<0,05

## 6.2. Avaliação clínica

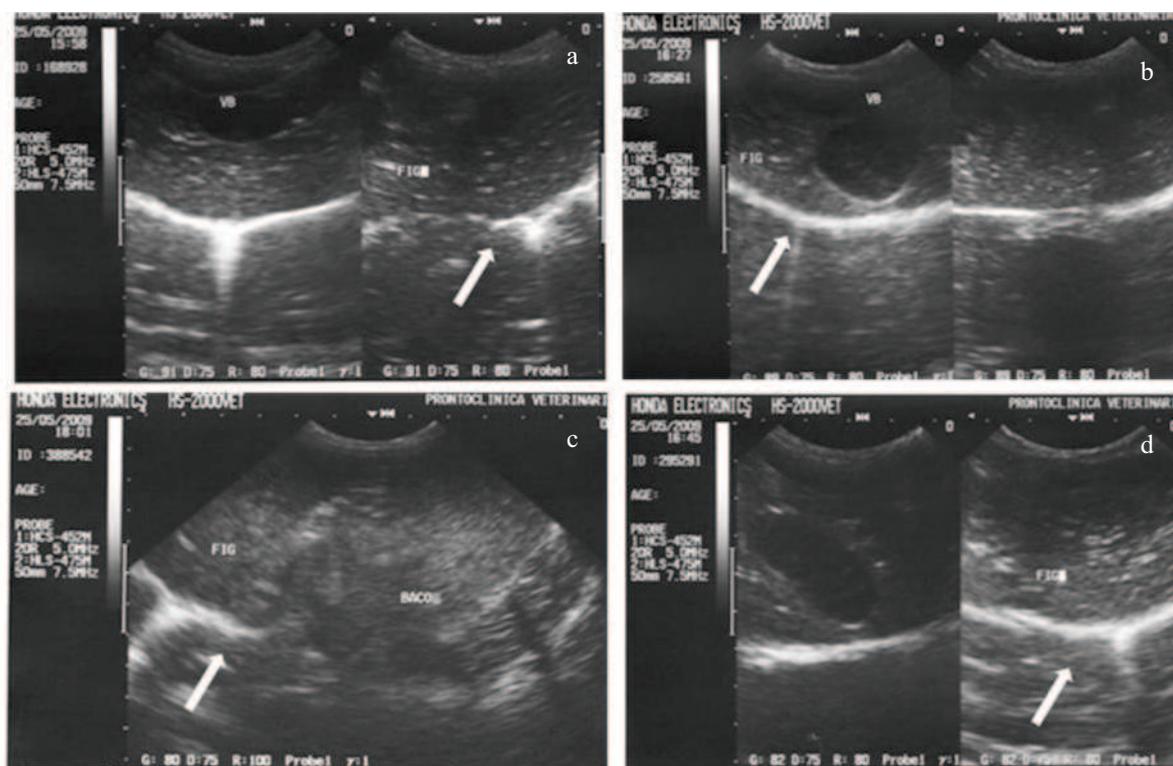
Após contenção física, os animais foram examinados e classificados, clinicamente, segundo escores de gravidade que variavam de 0 a 10 pontos, adaptados de Manna, et al (2009), foram observados o tamanho do linfonodo poplíteo, comprometimento da pele, alteração no peso corporal, presença de lesões oculares entre outros parâmetros. Os dois grupos tratados apresentavam-se clinicamente semelhantes no início dos tratamentos (Figura 6a), entretanto após 90 dias os cães tratados com Haloacetamido apresentaram uma ligeira piora no estado clínico ao contrário dos cães tratados com Alopurinol. Noventa dias após a suspensão das drogas, os cães permaneceram com estado clínico comparável ao início dos tratamentos, sem diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 6b).



**Figura 6. Escores clínicos dos cães infectados por *Leishmania chagasi*.** As avaliações foram realizadas periodicamente. a- Dia 0 de tratamento e 90º Dia de tratamento e b- 90º Dia sem tratamento. Os dados representam a média ± S.D de dez animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Alopurinol.

### 6.3. Ultrassonografia

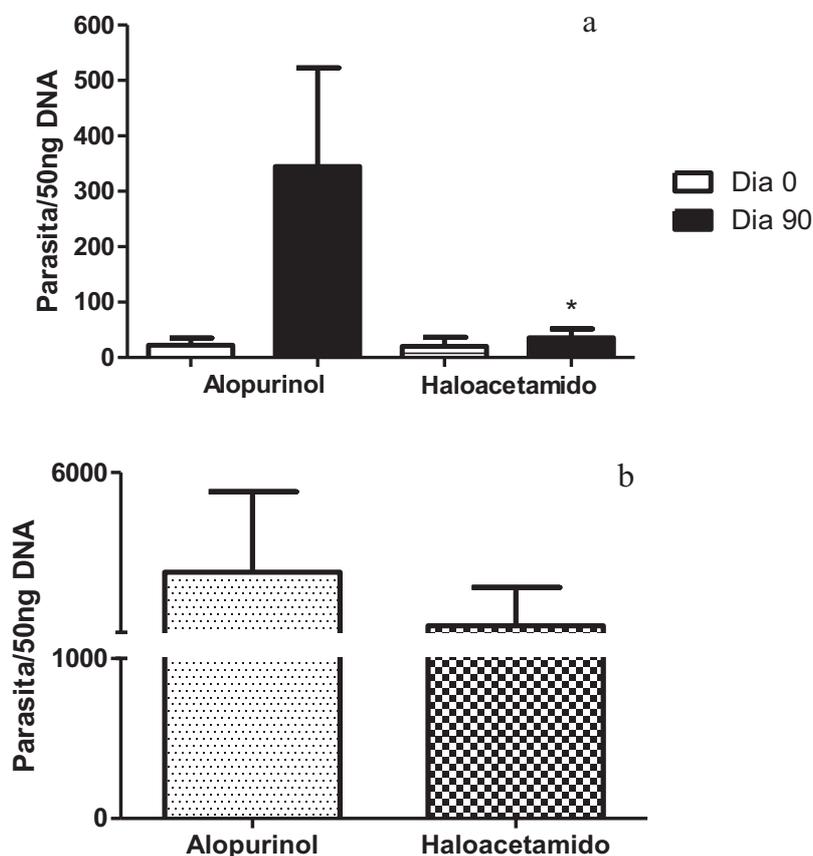
O exame ultrassonográfico realizado antes do tratamento e após 90 dias do mesmo, mostrou que os cães tratados com Alopurinol e Haloacetamido permaneceram com quadro de hepatoesplenomegalia durante toda a pesquisa (Figura 7).



**Figura 7- Ultrassonografia abdominal de cães infectados por *Leishmania chagasi* . Os cães foram contidos e os órgãos abdominais avaliados com o uso do aparelho de ultrassonografia portátil da marca Honda - Ultrasonic scanner - Modelo: HS-2000 - SN:22010999. - Sonda - 7.5 MhZ, quanto à dimensão, ecotextura e arquitetura. Fotos a e b – Fígado de cães tratados com Alopurinol; Fotos c e d – Fígado de cães tratados com Haloacetamido. As setas indicam hepatoesplenomegalia.**

#### 6.4. Carga parasitária

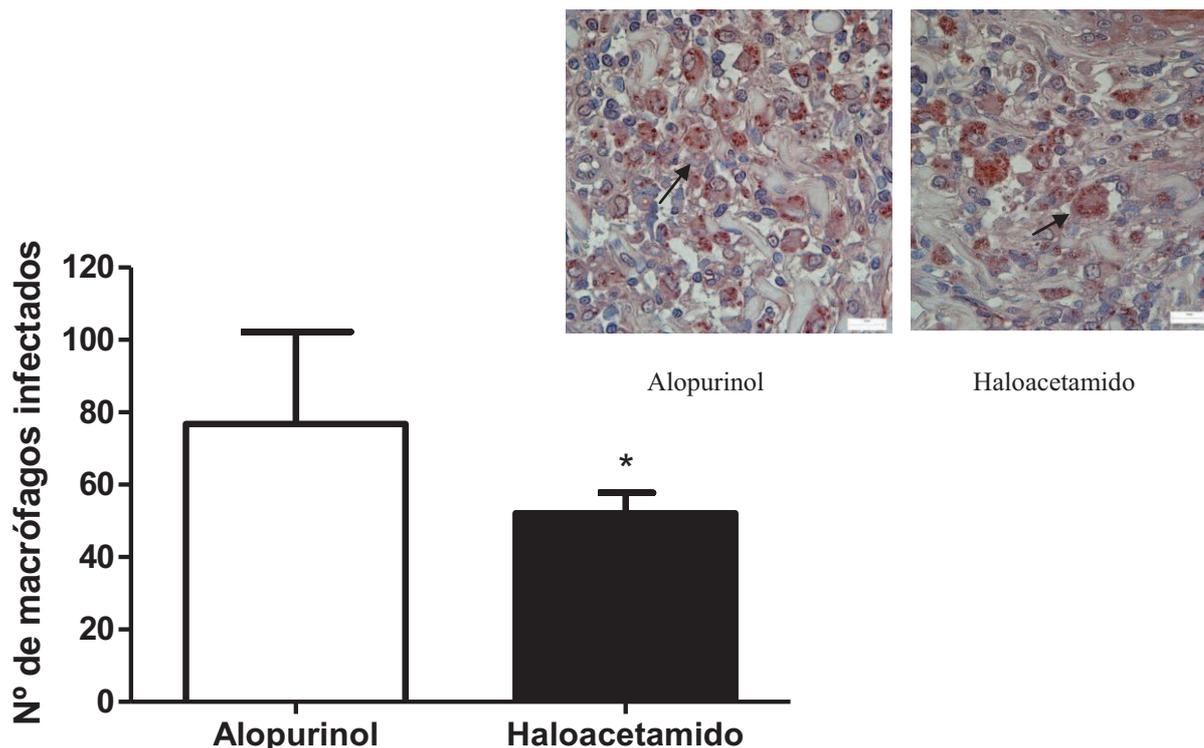
A quantificação da carga parasitária em amostras obtidas por aspirado de linfonodo poplíteo, foi realizada por real time PCR. Os grupos estudados apresentaram cargas parasitárias semelhantes antes dos tratamentos (Figura 8a), o que não se manteve constante após 90 dias, onde a carga parasitária foi significativamente reduzida nos cães que receberam Haloacetamido em comparação aos animais tratados com Alopurinol. Em contrapartida, 90 dias após a suspensão dos tratamentos, os grupos permaneceram com carga parasitária elevada e semelhante (Figura 8b).



**Figura 8- Quantificação da carga parasitária de cães infectados por *Leishmania chagasi*.** Para determinação da carga parasitária nos linfonodos, 50ng de DNA de amostra de todos os animais foi usada para quantificação por PCR em tempo real. As quantificações foram realizadas periodicamente, a- Dia 0 de tratamento e 90 º Dia de tratamento e b- 90 º Dia sem tratamento. Os dados representam a média  $\pm$  S.D de dez animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$ , em relação ao grupo Alopurinol.

## 6.5. Imunohistoquímica

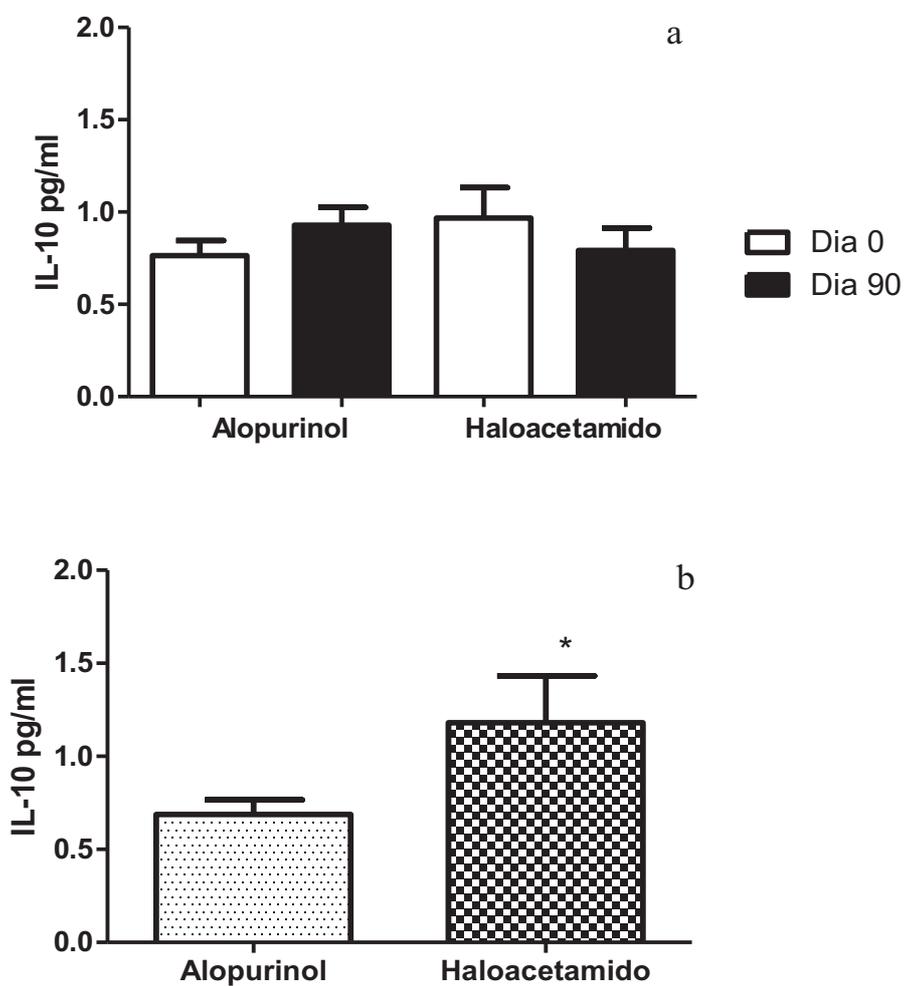
Fragmentos de pele foram também submetidos a técnica de imunohistoquímica, para visualização e contagem do número de macrófagos infectados. Os resultados demonstraram uma redução no número de macrófagos infectados com formas amastigotas de *L.chagasi*, nos cães tratados com Haloacetamido em comparação aos animais que receberam Alopurinol no 90º dia de tratamento (Figura 9).

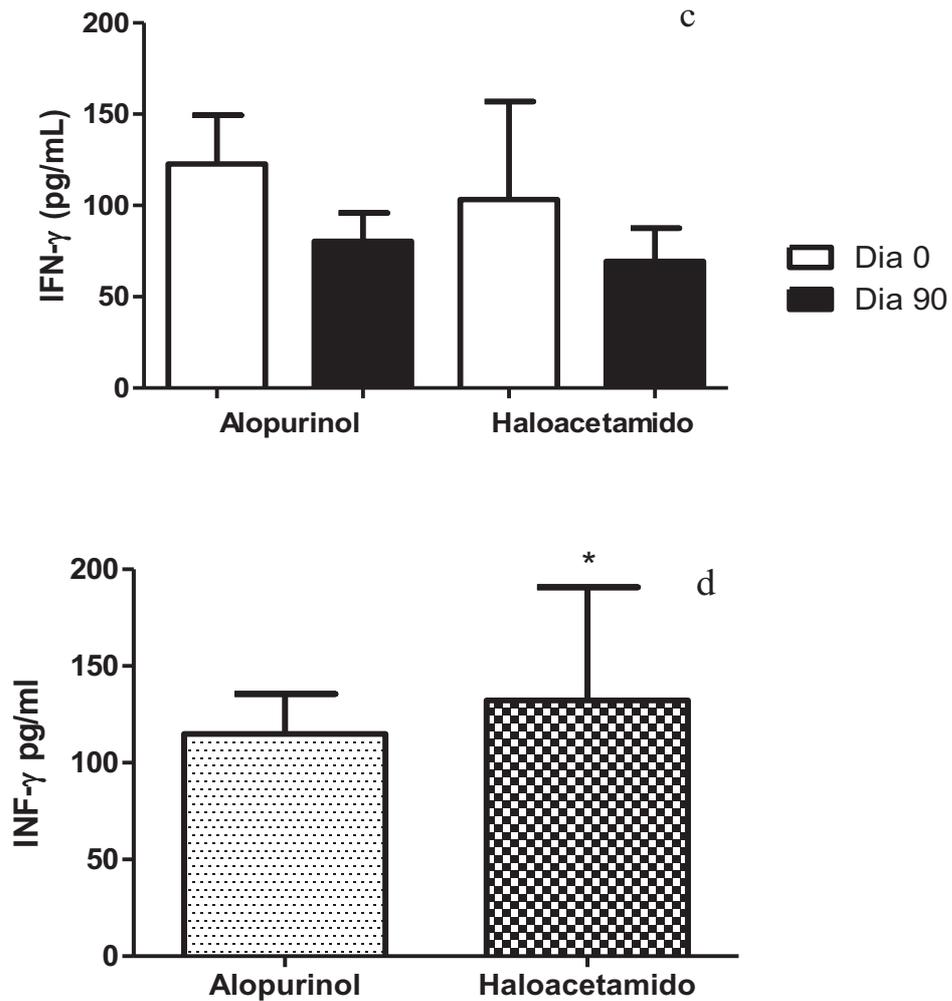


**Figura 9- Número de macrófagos infectados por *Leishmania chagasi*.** Fragmentos de pele foram submetidos à técnica de imunohistoquímica, para visualização e contagem do número de macrófagos infectados, após 90 dias de tratamento. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico de luz comum através da contagem de cinco campos por dois patologistas diferentes em objetiva de 40x. Foi considerada a média das contagens de cinco lâminas por grupo. Os dados representam a média ± S.D das contagens por grupo. \* $p \leq 0,05$

## 6.6. Determinação de citocinas no soro

Em relação a produção das citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$ , não foram detectadas diferenças entre os grupos durante os 90 dias de tratamento (Figura 10 a,c). Entretanto, 90 dias após a suspensão dos mesmos ocorreu aumento na produção, tanto de IL-10 como de IFN- $\gamma$  (Figura 10b, d) nos animais tratados com Haloacetamido em comparação aos cães que receberam Alopurinol .

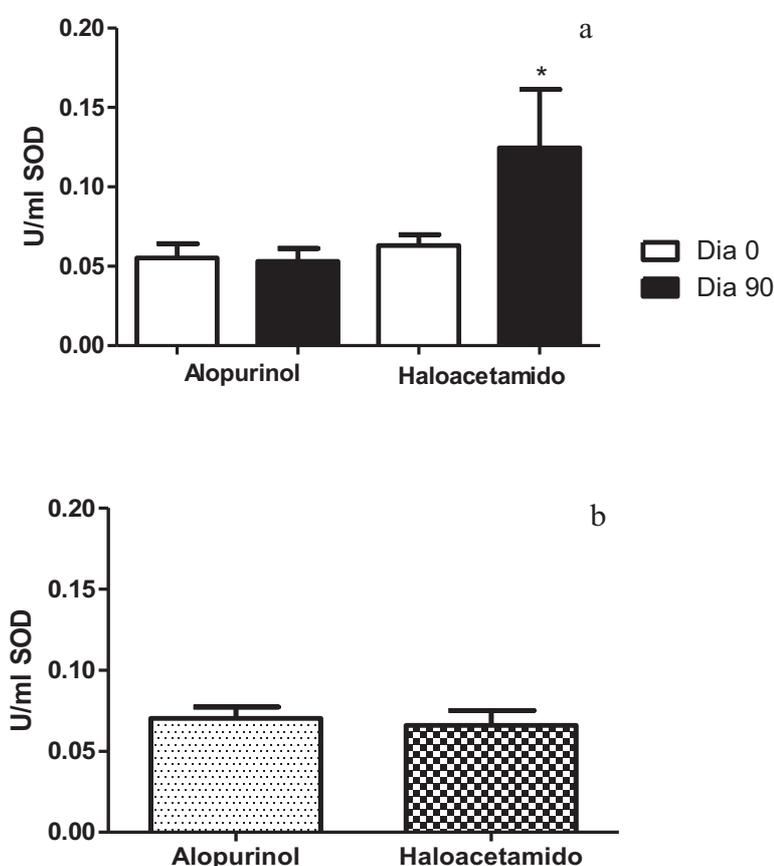




**Figura 10– Quantificação de citocinas em cães infectados por *Leishmania.chagasi*.** A presença das citocinas IL-10 e IFN-g foi quantificada no soro, pelo método de ELISA de acordo com as especificações do Kit R&D Systems .As quantificações foram realizadas periodicamente, A e C- Dia 0 de tratamento e -90 º Dia de tratamento ;B e D- 90 º Dia sem tratamento. Os dados representam a média  $\pm$  S.D de dez animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$ .

## 6.7. Produção de Superóxido Dismutase

Foi quantificada a produção de SOD no soro de todos os cães. Foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos somente no 90<sup>o</sup> dia de tratamento, onde houve aumento na produção de SOD pelos cães que receberam Haloacetamido em comparação aos animais tratados com Alopurinol (Figura 11a). Nos demais tempos avaliados não foram encontradas diferenças relevantes (Figura 11b).



**Figura 11– Produção de Superóxido Dismutase em cães infectados por *L.chagasi*.**

Foi quantificada a produção de superóxido dismutase no soro de todos os cães, conforme protocolo do Kit da Calbiochem / Superoxide Dismutase Assay Kit II. As quantificações foram realizadas periodicamente, a- Dia 0 de tratamento e 90<sup>o</sup> Dia de tratamento e b- 90<sup>o</sup> Dia sem tratamento. Os dados representam a média  $\pm$  S.D de dez animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$ , em relação ao grupo Alopurinol.

## 7. DISCUSSÃO

Os tratamentos permitidos pela OMS para Leishmaniose Visceral Canina podem levar a um controle temporário da doença, porém acompanhado de permanente remissão de sinais clínicos, não apresentando até o momento nenhum eficiente para eliminação total e a longo prazo dos parasitos. As quimioterapias atuais não garantem erradicação dos parasitos e conseqüentemente não exclui os cães como fonte de infecção vetorial.

Os tratamentos mais comuns utilizados para LVC são baseados no uso de Antimoniais e de Alopurinol, sendo, frequentemente, usados em combinação (Gaskin et al., 2002). O uso dos antimoniais pentavalentes pode ser feito por quatro a oito semanas enquanto o Alopurinol é geralmente administrado por longos meses até a completa estabilização e redução dos sinais clínicos dos animais. Entretanto, no Brasil, o Antimoniato de Meglumina (*Glucantime*®) tem sua distribuição e uso restrito ao serviço público de saúde, destinado ao tratamento humano, não podendo ser utilizado para o tratamento da LVC (MS., 2006).

O que se tem observado portanto, em relação aos tratamentos disponíveis e que na maioria dos casos a cura clínica não é acompanhada da eliminação ou redução do protozoário, levando a uma ineficácia terapêutica. Larangeira. (2008) sugere que a elaboração de um perfil clínico, bioquímico e imunopatológico pode servir como base para esclarecer questões relacionadas à evolução da infecção no cão tratado ou não, servindo para identificar animais infectados transmissores e não transmissores do parasito para o vetor, favorecendo assim um possível controle da doença.

As avaliações sistematizadas dos animais tratados trazem informações indispensáveis para avaliação do uso de novos quimioterápicos. O acompanhamento das funções hepática e renal dos cães com LVC não tem nenhum valor de preponderante para o diagnóstico da doença, porém estes parâmetros podem fornecer importantes informações para a avaliação do estado clínico dos animais, do prognóstico da doença e da evolução de cães tratados (Costa-Val et al., 2007).

A avaliação hepática em nosso estudo, foi realizada através da quantificação de AST, ALT e fosfatase alcalina. Nossos resultados demonstraram que as concentrações

séricas dessas enzimas, foram normais durante o tratamento com Haloacetamido, não induzindo alterações hepáticas detectáveis bioquimicamente, mesmo após tratamento diário, sendo portanto bastante satisfatório. Durante a progressão da doença uma das manifestações mais comuns é o aumento hepático causado pela intensa reação inflamatória crônica nesse órgão, além da presença de granulomas intralobulares bem organizados tanto em animais sintomáticos como assintomáticos( Tafuri et al., 1996; Tafuri et al., 2001; Santana et al., 2007). Porém, é baixa a frequência de alterações bioquímicas detectadas nos exames laboratoriais.

Isso foi observado em nosso estudo como mostram os resultados das ultrassonografias abdominais com predominância de hepatoesplenomegalia porém ausência de alterações nos parâmetros bioquímicos. A permanência da hepatoesplenomegalia ocorre possivelmente devido a ausência de supressão do sistema imune, uma vez que essa resposta é altamente ativada durante a resposta ao antígeno de *Leishmania* ( Kenney et al., 1998) ou mesmo a diante de tratamento.

A insuficiência renal caracterizada pelo desenvolvimento de lesões renais irreversíveis e perda de função renal (Polzin, 1997), pode ser detectada pela mensuração das concentrações plásmaticas de creatinina e uréia, onde foi detectada uma redução com noventa dias de tratamento com Alopurinol, mantendo-se entre os valores de referências normais nos períodos posteriores nos dois grupos tratados. O Alopurinol sozinho ou em combinação geralmente possui baixa toxicidade (Baneth e Shaw., 2002) o que explica a alteração das concentrações séricas de uréia vistas somente pontualmente. De acordo com Rigo et al. (2009) o comprometimento renal no calazar deve-se tanto à ação direta da *Leishmania* no interstício renal quanto ao tratamento com as medicações leishmanicidas, portanto a redução ou manutenção normais das taxas de uréia nos sugere um bom prognóstico, indicando sua competência para filtração e eliminação de creatinina.

O principal desafio na aplicação de uma nova terapia para LVC é constatar sua capacidade em reduzir ou eliminar os parasitos dos órgãos alvos. O tratamento com Haloacetamido, em apenas noventa dias, além de não causar alterações nos parâmetros bioquímicos avaliados , reduziu consideravelmente, a carga parasitária no linfonodo dos animais tratados em comparação ao tratamento com Alopurinol.

O Haloacetamido já é bem descrito por atuar em células cancerígenas (Jiang et al., 1998), possuindo uma capacidade antiproliferativa e antimicrotubulo. A família das tubulinas possuem altos níveis de heterogeneidade transcricional e pós- transcricional (Cleveland et al., 1985; Joshi et al.,1990; Luduena et al., 1998) e algumas variações neste sentido são descritas nas *Leishmanias*, que podem conter um pool de tubulinas com diferentes funções para o parasito. (Coulson et al., 1996; Fong et al., 1984). Logo, o Haloacetamido age eficientemente desorganizando o complexo de microtubulos, atuando no desenvolvimento do parasito, sendo mostrada sua atividade entre espécies diferentes de *Leishmania* (Hiam., 2006).

Conforme mostrado na figura acima , a redução da carga parasitária foi evidente nos cães tratados com Haloacetamido quando comparado ao uso do Alopurinol, o qual apresentou melhora clínica porém sem redução de carga parasitária. O tratamento com Alopurinol sozinho ou em associação com Miltefosina ou com Antimoniais é reconhecidamente descritos por resultar em cura clínica satisfatória (Miró et al., 2008; Denerolle and Bourdoiseau., 1999; Vercammen et al., 2002; Manna et al., 2008), por outro lado esse tratamento não reduz a carga parasitária destes animais (Koutinas et al., 2001; Baneth and Shaw, 2002) o que reforça nossos achados.

Drogas como a Miltefosina foi primeiramente descrita por sua utilização como agente antineoplásico e depois como nova droga para tratamento de leishmaniose visceral humana ( Sundar et al., 1998; Bhattacharya et al., 2007; Mohebbali et al., 2007), apesar de não possuir atividade anti-*Leishmania* direta e sim na ativação de células T e macrófagos e produção de reativos intermediarios de nitrogênio e oxigênio, mecanismo este já bastante descrito para eliminação do parasito.

Como bem já se sabe, a produção de óxido nítrico pode estar relacionada com a redução da viabilidade parasitária (Pinelli et al., 1994; Moreno et al., 2002), em contrapartida também pode ser um potencial agente imunossupressor em altas concentrações como já descrito em outras infecções (Sternberg et al., 1994; Cox, 1997).

Buscando investigar se o Haloacetamido está envolvido na produção e controle desses metabólitos, nosso trabalho investigou a secreção de óxido nítrico no soro dos animais e não encontramos diferenças durante trinta dias de tratamento (dados não mostrados). Avaliamos também a secreção da enzima superóxido dismutase, já que

existem evidências que esse complexo enzimático pode estar fortemente relacionado a sobrevivência da *Leishmania* no curso da infecção (Ghosh et al., 2008). Observamos que houve um aumento na produção de SOD pelos cães que receberam Haloacetamido em comparação aos animais tratados com Alopurinol após noventa dias de tratamento. Nos demais tempos avaliados não foram encontradas diferenças relevantes.

Células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos são capazes de eliminar microorganismos invasores por um mecanismo dependente de oxigênio, processo denominado “burst” respiratório. Durante esse processo ocorre um consumo acentuado de oxigênio e uma série de reações que culminam com a formação de enzimas como o SOD (Klebanoff, 1992; Rotrosen, 1992). O SOD tem função importante por catalizar a reação de formação de peróxido de hidrogênio, esse composto portanto pode ser importante no aumento da produção destas moléculas potencializando o papel do macrófago como agente leishmanicida. Dessa forma, a indução do aumento de SOD durante o tratamento com Haloacetamido pode ser um dos mecanismos que pode contribuir para morte de parasitos.

O Alopurinol inibidor da xantina oxidase, mesmo agindo por um mecanismo diferente pode ser indiretamente um agente antioxidante atuando como o SOD (Campos et al., 2004). O processo de oxidação promovido pela xantina oxidase é responsável pela produção de reativos intermediários de oxigênio (Granger et al., 1990). A combinação de agentes antioxidantes (sinergismo) pode ser importante para reduzir lesões oxidativas nos tecidos (Michael et al., 1985), entretanto esses metabólitos podem competir em alguma etapa por substratos em comum. O uso do Alopurinol pode levar a um bloqueio na produção de SOD, por isso não foram detectadas alterações nessa enzima nos cães que receberam esse tratamento.

Fridovich (1978), Plewes et al. (2003) e Getachew & Gedamu (2007), sugerem que enzimas como SOD tem um papel importante na regulação de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, incluindo ânion superóxido, produzidos por macrófagos durante a infecção por microorganismos. Segundo Bricks (1994) os macrófagos, por meio do mecanismo oxidativo, produzem superóxido utilizando enzimas que contêm ferro. O O<sub>2</sub><sup>-</sup> produzido é, então, transformado em peróxido de hidrogênio que, ao ligar-se à enzima mieloperoxidase, passa a ter uma ação citolítica sobre esses patógenos.

Tal mecanismo pode ser sugerido para explicar a redução do número de macrófagos infectados com formas amastigotas de *L.chagasi*, nos cães tratados com Haloacetamido em comparação aos animais que receberam Alopurinol no 90º dia de tratamento.

Outro aspecto importante a ser discutido foi o aparente controle na produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-10. O aumento destas citocinas foi detectado apenas noventa dias após suspensão do tratamento com Haloacetamido. Caldas et al. (2005), demonstraram que pacientes com LVA apresentam alta concentração de IFN- $\gamma$ , a qual é reduzida a medida que o tratamento com antimoniais é aplicado. O que corrobora com nossos achados, onde ocorre aumento dessa citocina na ausência dos tratamentos.

Estes dados em conjunto nos levam a sugerir que elevadas concentrações de IFN- $\gamma$  podem estar associados a severidade da infecção, ainda que indiretamente. Entretanto, alguns autores, indicam o aumento de IFN- $\gamma$  como bom prognóstico para o controle da infecção (Manna, et al., 2008) mostrando que no início da doença canina ocorre um misto de resposta Th1/Th2 e com o decorrer do tempo de tratamento com Alopurinol e Miltefosina e redução da carga parasitária o perfil Th1 é prevalente porém se aumenta a carga parasitária essa resposta é significativamente reduzida.

Alguns estudos são bastante controversos no que diz respeito a produção de citocinas em cães infectados. Pinelli et al. (1994) e Santos Gomes et al. (2002) sugerem uma associação entre a resistência e a produção de citocinas do padrão Th1. Por outro lado Quinnell et al. (2001) mostram não haver essa associação em cães naturalmente infectados por *L.chagasi*. Strauss-Ayali et al.(2007) e Manna et al.(2006) demonstraram que a produção de IL-10 não muda no curso da infecção por *Leishmania* e nem mostra-se diferente quando comparada a produção em animais sintomáticos e assintomáticos.

Em nosso estudo a aumento de IL-10 só foi detectado após noventa dias da suspensão do tratamento, esse achado pode estar relacionado com o aumento da carga parasitária e progressão da infecção. Esse fato já foi demonstrado em outra pesquisa por Reis et al, (2008). Essa citocina já foi descrita por suprimir a função de outras células como NK e células T atuando na inibição de mecanismos como apresentação de antígenos e secreção de citocinas importantes como IFN- $\gamma$  (Trinchieri, 2007). A IL-10 quando produzidas por células CD4+Foxp3+CD25+, células regulatórias (Trinchieri,

2007) reduz consideravelmente a habilidade do sistema imunológico em controlar a infecção por parasitos.

Mostramos que o tratamento com Haloacetamido não induziu toxicidade hepática e renal e reduziu a carga parasitária no linfonodo e pele dos cães, apesar desse resultado não se refletir em melhora clínica, o que não compromete a eficácia do tratamento visto que a terapeutica com Alopurinol induz excelentes resultados clinicamente, porém não reduz a carga parasitária. Além disso, o tratamento possivelmente promove um balanço na secreção de citocinas o que pode ser um mecanismo importante de controle, embora nossa principal sugestão seja de um efeito direto da droga no desenvolvimento do parasito, sem apresentar necessariamente um efeito imunomodulador. São necessários portanto, estudos complementares para comprovar a eficiência do uso desta droga no tratamento da leishmaniose visceral canina.

## 8. CONCLUSÕES

- O tratamento com Haloacetamido não induziu toxicidade hepática e renal
- Houve redução da carga parasitária no linfonodo e pele dos cães tratados com Haloacetamido em comparação aos animais que receberam Alopurinol, apesar desse resultado não se refletir em melhora clínica
- O tratamento com Haloacetamido possivelmente promoveu um balanço de citocinas, controlando a secreção de IL-10 e IFN- $\gamma$ , visto que o aumento nas concentrações das mesmas só foi observada após a suspensão do tratamento
- Os animais tratados com Haloacetamido apresentaram maior produção de SOD em comparação aos cães que receberam Alopurinol.
- São necessários estudos complementares para comprovar a eficácia a longo prazo deste novo composto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J.; CANAVETE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 2-64, 2004.

BHATTACHARYA SK, SINHA PK, SUNDAR S, THAKUR CP, JHA TK, PANDEY K. Phase 4 Trial of Miltefosine for the Treatment of Indian Visceral *Leishmaniasis*. **J. Infect. Dis.** v. 196, p. 591-8, 2007.

BANETH, G.; SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol.**, v. 106, n. 4, p. 315-24, 2002.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3. ed. **Canada: Saunders Elsevier**, 2006. cap. 73, p. 685-698.

BRICKS, L.F. Ferro e infecções: atualização. **Pediatria**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 34-43, set. 1994.

CALDAS, A.J.M.; SILVA, D.R.C.; PEREIRA, C.C.R.; NUNES, P.M.S.; SILVA, B.P.; SILVA, A.A.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luis – MA, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 445-451, 2001.

CAMPOS, E.B.P.; WINSTON, B. Y. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **J. Vasc. Br.**, v. 3, n. 4, p. 357-366, 2004.

CLEVELAND, D.W.; SULLIVAN, K.F. Molecular biology and genetics of tubulin. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 331–365, 1985.

COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; GONTIJO, N.F.; MICHALICK, M.S.M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet. J.**, London, v.174, p.636-643, 2007.

COULSON, R.M.R.; CONNOR, V.; CHEN, J.C.; AJIOKA, J.W. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 82, p. 227-236, 1996.

CROFT, SIMON L.; SUNDAR, SHYAM; FAIRLAMB, ALAN H. American Society for Microbiology. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinic. Microbiol.Rev.** , v. 19, n. 1, p. 111-126, Jan. 2006.

COX, F.E.G. Designer vaccines for parasitic diseases. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, p. 1147-1157, 1997.

DENEROLLE, P.; BOURDOISEAU, G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). **J. Vet. Int. Med.** v. 13, p. 413-15, 1999.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of realtime PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 137, p. 214-22, 2006 .

FERRER, L. Leishmaniosis update in diagnosis and therapy. **Proceedings of the 14th Annual Congress ESVD-ECVD PISA**, p. 33-36, 1997.

FONG, D.; WALLACH, J.K.; MELERA, P.W.; CHANG, K.P. Differential expression of mRNAs for  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin during differentiation of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 5782-5786, Sep. 1984.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**, Washington DC, v. 201, n. 4359, p. 875-880, Sept. 1978.

GARCIA, A.M. **Estudo da infecção e doença no cão (*Canis familiaris*) *Leishmania (Leishmania) chagasi* em uma área endêmica na ilha de São Luís-Maranhão, Brasil.** 2004. 101f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2004.

GASKIN, A.A.; SCHANTZ, P.; JACKSON, J.; BIRKENHEUER, A.; TOMLINSON, L.; GRAMICCIA, M., LEVY, M.; STEURER, F.; KOLLMAR, E.; HEGARTY, B.C.;

AHN, A.; BREITSCHWERDT, E.B. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 16, n. 1, p. 34-44, Jan-Feb. 2002.

GETACHEW, F.; GEDAMU, L. Leishmania donovani iron superoxide dismutase A is targeted to the mitochondria by its N-terminal positively charged amino acids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Heidelberg, v. 154, n. 1, p. 62-69, Jul. 2007.

GINEL, P.J.; LUCENA, R.; LÓPEZ, R.; MOLLEDA, J.M. Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. **J. of Small Animal Practice**, v. 39, p. 271-274, 1998.

GRADONI, L.; MAROLI, M.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F. *Leishmania infantum* infection rates in Phlebotomus perniciosus fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. **Med. Vet. Entomol.**, v. 1, p. 339-42, 1987.

GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, p.685-698, 2006.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **The Lancet**, Atlanta, v. 354(9185), p.1191-1199, 1999.

HIAM, A.; SEBASTIEN, D.; GEORGE, B.; ARLETTE, F.; KALIL, J.; LE PAPE, P. Microtubule target for new antileishmanial drugs based on ethyl3-haloacetamidobenzoates. **J. Enz. Inhibit. Medic. Chemist.**, v. 21, n. 3, p. 1-8, 2006.

KENNEY, R.T.; SACKS, D.L.; GAM, A.A.; MURRAY, H.W. & SUNDAR, S. - Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment. **J. infect. Dis.**, **177**: 815-818, 1998.

JIANG, J.D.; DAVIS, A.S.; MIDDLETON, K.; LING, Y.H.; PEREZ-SOLER, R.; HOLLAND, J.F.; BEKESI, J.G. 3-(haloacetamido)-benzoylurea: a novel canceridal tubulin ligand that inhibits microtubule polymerization, phosphorylates  $\beta$ 12 and induces apoptosis in tumor cells. **Cancer Res.**, v. 58, p. 5389-5395, 1998.

JOSHI, H.C., CLEVELAND, D.W. Diversity among tubulin subunits: toward what functional end? **Cell. Motil. Cytoskel.**, v. 16, p. 159-163, 1990 .

KLEBANOFF, S.J. Oxygen metabolites from phagocytes. *In* Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates (J.I. Gallin, I.M. Goldstein, and R. Snyderman, eds.) pp. 541-588. Raven Press, New York, 1992.

KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L.; POLIZOPOULOU, Z.; BILLINIS, C.; ARGYRIADIS, D.; DIAKOU, N.; PAPADOPOULOS, O. A randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 98, n. 4, p. 247-261, 2001.

LAMOTHE, J. Essai de traitement de la leishmaniose canine par l'amphotericin B. 39 cas. **Pract. Méd. Chir. An. Comp.**, v. 32, p. 133-141, 1997 .

LARANGEIRA, D.F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor.** 2008. 79f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2008.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 68, n.2, p. 151-162, 2005.

LESTER, S.J.; KENYON, J.E. Use of allopurinol to treat visceral leishmaniosis in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 209, n. 3, p. 615-7, Aug. 1996.

LUDUENA, R. F. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. **Int. Rev. Cytol.**, v. 178, p. 207-275, 1998.

MANNA, L.; REALE, S., VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V.F.; MICHELE, P.L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A.E. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 142, p. 271-280, 2006.

MANNA L, GRAVINO AE, PICILLO E, DECARO N, Buonavoglia C. Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. **Ann N Y Acad Sci**, 2008.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PICILLO, E.; PAVONE, L.M.; GRAVINO, A.E. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet. J.**, v. 177, n. 2, p. 279-82, Aug. 2008.

MANNA, LAURA; REALE, STEFANO; VITALE, FABRIZIO; GRAVINO, ANGELO ELIO. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res. Vet. Science**, v. 87, n. 1, p. 76-78, Aug. 2009.

MICHAEL, J. Effects of Superoxide Dismutase and Allopurinol on the Survival of Acute Island Skin Flaps. **Ann. Surg.**, v. 201, n. 3, Mar. 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde - Brasil. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, 2006. 126p

MIRÓ, G.; MATEO, I.; CAÑAVATE, C.; NIETO, J.; MONTOYA, A.; GALY, S.; MÉDAILLE, C.; ALVAR, J. Miltefosine: A new treatment for canine leishmaniosis. **In: Abstract book of Third World Congress on Leishmaniosis**. Sicília: [s.n.], 2005, 171 p.

MIRÓ, G. Leishmaniose canina: avanços no controlo da doença. **[Videoconferência Interactiva Ibérica: Doenças dos cães transmitidas por vectores]**. Lisboa: Bayer HealthCare: Saúde Animal, 2008.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDREAS, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v 88, p. 491-493, 1994.

MOHEBALI, M. Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. **Acta Tropica**, v. 103, p. 33-40, 2007.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.**, vol. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

NIETO, J.; SAUGAR, J. M.; MIRET, J.; GONZÁLES, F. La Leishmaniosis canina. 1ª Parte. **Inf. Vet. Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España**, p. 34-40, jun. 2005.

PINELLI, E. R KILLICK-KENDRICK, J WAGENAAR, W BERNADINA, G DEL REAL, AND J RUITENBERG, Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PLEWES, K. A.; BARR, S. D.; GEDAMU, L. Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 71, n. 10, p. 5910-5920, 2003.

POLZIN, D. J. Insuficiência Renal Crônica. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, 1. ed. São Paulo: Manole, p. 2394- 2431, 1997.

QUINNELL, R.J. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J.Infect. Dis.**, Chicago, v.183, p.1421-1424, 2001.

RIBEIRO, V. M.; RAJÃO, R. A.; DE ARAÚJO DINIZ, S.; MICHALICK, M. S. M. Evaluation of the potential transmission of visceral leishmaniasis in a canine shelter. **Rev. Méd. Vet.**, v. 156, n. 1, p. 20-22, 2005.

RIGO, R.S.; RIGO, L.; HONER, M.R. Aspectos Clínicos e Laboratoriais na Leishmaniose Visceral Americana. **J. Bras. Nefrol.**, v. 31, n. 1, p. 48-54, 2009.

ROTROSEN, D. The respiratory burst oxidase. In: Gallin, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SYNDERMAN, R. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. **Raven Press**, New York, p. 589-601, 1992.

SANTANA, C. C. ; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A. R.; OLIVEIRA, G. G. S; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS , W. L. C. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunol.**, 28 jul. 2007.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immun. Immunopathol.**88, 21-30, 2002.

SILVA, E. S. et al. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania species*. **Trends in Parasitol.**, v. 21, n. 12, Dec. 2005.

STERNBERG, J.; MABBOTT, N.; SUTHERLAND, I.; LIEW, F.Y. Inhibition of nitric oxide synthesis leads to reduced parasitemia in murine *Trypanosoma brucei* infection. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 2135-2137, 1994 .

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C.L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet. Res.**, v. 38, p. 547-564, 2007.

SUNDAR S, ROSENKAIMER F, MAKHARIA MK. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. **Lancet** ., 352:1821–3, 1998.

TAFURI, W.L.; BARBOSA, A.J.A.; MICHALICK, MS; GENARO, O.; FRANCA-SILVA, JC; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 38, p. 81-89, 1996.

TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral *leishmaniasis*: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 96, p. 203-212, 2001.

TRINCHIERI, GIORGIO. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 2, p. 239-243, 2007.

VERCAMMEN, F.; FERNANDEZ-PEREZ, F.J.; DEL AMO, C.; ALUNDA, J.M. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. **Acta Trop.**, v. 84, p. 175–181, 2002.

## **APÊNDICES**

## TERMO DE CONSENTIMENTO

Código cão:

Prezado Sr<sup>(a)</sup>.

Estamos realizando a pesquisa sobre os **Aspectos Clínicos e Imunológicos das Leishmanioses no Estado do Maranhão – Brasil** com objetivo de detectar os fatores que determinam a transmissão e a prevalência do calazar na área da Vila Nova (Raposa) e produzir conhecimentos que possam contribuir para a melhoria das medidas de controle atualmente adotadas em relação a esta doença. Para tanto, precisamos realizar a coleta de amostras de sangue para triagem dos cães infectados nesta área.

Frisamos que, em caso de positividade no exame de triagem para detecção do calazar, a lista dos cães infectados será repassada para o pessoal da Vigilância Sanitária, que será responsável pelo recolhimento dos cães (como determina o Ministério da Saúde). A retirada dos cães será supervisionada pela equipe que realiza este trabalho.

Necessitamos, portanto, de sua valiosa colaboração no sentido de que nos autorize a incluir seu cão nesta pesquisa, liberando-o para que possamos realizar a coleta acima mencionada.

São Luís, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Ass. Responsável (de acordo): \_\_\_\_\_

Pesquisadores:

Profª Drª Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (Bióloga-UFMA)

Prof. Dr. José Manuel Macário Rebelo (Biólogo-UFMA)

Prof. Dr. Silma Regina Pereira Martins (Bióloga-UFMA)

Profª. Drª. Aldina Barral (Médica-Fiocruz-BA))

Ms. Arnaldo Muniz Garcia (Veterinário)

Cristiane Costa de Carvalho (Aluna do Mestrado em Saúde e Ambiente-UFMA)

João Freitas de Almeida (Aluno do Mestrado em Saúde e Ambiente-UFMA)

Lucilene Amorim Silva (Aluna do Doutorado em Patologia –Fiocruz-BA)

Rafael Marciano Jacob Ferreira Leite (Acadêmico de Farmácia-UFMA)