

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM SAÚDE E AMBIENTE**

**SOROPREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA E RELAÇÃO ENTRE SUBCLASSES DE IgG E
SINTOMATOLOGIA CLÍNICA.**

JOÃO FREITAS DE ALMEIDA

**São Luís
2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM SAÚDE E AMBIENTE

**SOROPREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
E RELAÇÃO ENTRE SUBCLASSES DE IgG E
SINTOMATOLOGIA CLÍNICA.**

Aluno: **JOÃO FREITAS DE ALMEIDA**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Flávia Raquel F. Nascimento

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Ambiente.

São Luís
2006

Almeida, João Freitas de

Soroprevalência de leishmaniose visceral canina e relação entre subclasses de IgG e sintomatologia clínica / João Freitas de Almeida. - São Luis, 2006.

84 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão, 2006.

1. Leishmaniose visceral canina – Raposa (MA). 2. Níveis sorológicos IgG. I. Título.

CDU 616.993.161(812.12)

Dedico este trabalho à
minha família.

AGRADECIMENTOS

A FAPEMA pela bolsa de estudo cedida.

A Universidade Federal do Maranhão; por oportunizar a realização deste mestrado.

A Flavia Nascimento, pela orientação apoio e compreensão.

A Cristiane Carvalho pelo seu incondicional apoio e companheirismo.

A todos os colegas do Mestrado em Saúde e Ambiente e do Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão.

JOÃO FREITAS DE ALMEIDA

**Soroprevalência de leishmaniose visceral canina e relação entre
subclasses de IgG e sintomatologia clínica.**

**Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de
Mestrado.**

Presidente _____

(Orientador)

1º Examinador _____

2º Examinador _____

3º Examinador _____

Suplente _____

SUMÁRIO

	p.
1. APRESENTAÇÃO	8
2. OBJETIVOS	9
3. ARTIGO 1	10
4. ARTIGO 2	25
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS	50

APRESENTAÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmica ao redor do mundo, que afeta mais de 12 milhões de pessoas mundialmente, apresentando alta endemicidade, morbidade e mortalidade em populações da África, Ásia e América Latina (WHO, 2002).

No Brasil ocorre em todo o território, tanto a leishmaniose visceral (LV) 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 (Ministério da Saúde, 2003).

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 ao protozoário parasita (Moreno et al., 2002).

A leishmaniose visceral canina é uma doença debilitante onde se observa uma resposta dicotômica por parte dos cães, sendo que muitos dos animais infectados são susceptíveis e desenvolvem uma doença ativa, que é caracterizada por altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e habilidade linfoproliferativa deprimida, enquanto outros animais chegam a cura espontânea sem demonstrar sinais patentes da doença (Pinelli et al., 1994). A doença canina é caracterizada por lesões na pele, dermatite, linfadenopatia generalizada, ceratoconjuntivite, diarreia e onicogribose (Lima et al., 2003).

O cão é considerado o principal reservatório do parasita responsável pela leishmaniose visceral uma vez que se verifica haver sobreposição do habitat do homem

e do cão e freqüente contato com flebotomíneos zoo-antropofílicos. Além disso, a forma de parasitismo viscerocutânea, associada a elevadas taxas de infecção, favorece a transmissão pela picada do inseto, e como a leishmaniose visceral canina é uma doença de evolução crônica, nas áreas endêmicas em que a transmissão não é contínua a infecção do cão pode persistir de uma época de transmissão até a época seguinte (Abranches et al., 1998).

Estudos epidemiológicos e a investigação de parâmetros imunogenéticos que possam determinar o estabelecimento da resistência ou susceptibilidade à infecção são cruciais para o futuro controle da doença, pois fornecem ferramentas para o estabelecimento de metas para o controle da leishmaniose nas áreas endêmicas. O município de Raposa – MA, escolhido para o estudo atual, é uma área de urbanização recente, que agrega vários fatores que poderiam favorecer a manutenção da doença, o que de fato tem acontecido, como mostram os dados de infecção humana (Caldas et al., 2001) e canina (Garcia, 2004) registrados nesta área.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram:

- Atualizar os dados referentes a LVC na localidade de Vila Nova, situada no município da Raposa-MA (Artigo 1)
- Correlacionar os níveis sorológicos de IgG e de suas subclasses IgG1 e IgG2 com os sinais clínicos apresentada por cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi* (Artigo 2).

ARTIGO 1

25 **Resumo**

26

27 A localidade Vila Nova situada no município de Raposa, Maranhão, tem sido relatada
28 como área endêmica para a leishmaniose visceral. Sabendo da importância dos cães
29 como reservatório doméstico, este trabalho teve como objetivo identificar os cães
30 infectados para leishmaniose por meio de teste imunoenzimático (ELISA). Coletas de
31 sangue de todos os cães domiciliados na localidade foram realizadas no período de
32 fevereiro a abril de 2005, perfazendo uma amostra de 233 cães. Os resultados do ELISA
33 demonstraram que 69 cães apresentaram resultados positivos, correspondendo a uma
34 soroprevalência de aproximadamente 29,6% dos cães da localidade.

35

36 *Palavras-chave:* Soroprevalência, ELISA, leishmaniose visceral canina.

37 1. INTRODUÇÃO

38
39 As leishmanioses são doenças causadas por protozoários membros do gênero
40 *Leishmania*, parasitas que infectam numerosas espécies de mamíferos incluindo
41 humanos (Gramiccia et al., 2005). Neste gênero encontram-se aproximadamente 30
42 espécies das quais cerca de 20 causam doenças em humanos (Ashford, 2000).

43 A leishmaniose visceral americana (LVA) é causada nos países da América
44 Central e do Sul, incluindo o Brasil, pela *Leishmania chagasi*. Trata-se de uma doença
45 crônica caracterizada pela presença obrigatória de formas amastígotas do parasita nos
46 fagócitos mononucleares. Seu ciclo inclui um vetor, o flebotomíneo *Lutzomyia*
47 *longipalpis*, que transmite o parasita através de uma picada a um hospedeiro, geralmente
48 mamífero (Herwaldt, 1999 ; Tafuri et al., 2001).

49 Os canídeos representam reservatórios para as leishmanioses na China, na base
50 do Mediterrâneo e nas Américas. O ciclo doméstico é mantido pelos cães errantes (de
51 rua) e por cães selvagens, que têm progressiva associação com humanos (Moreno et al.,
52 2002).

53 O cão é considerado o principal reservatório do parasita responsável pela
54 leishmaniose visceral uma vez que se verifica haver sobreposição do habitat do homem
55 e do cão e freqüente contato com flebotomíneos zoo-antropofílicos. Além disso, a forma
56 de parasitismo viscerocutânea, associada a elevadas taxas de infecção, favorece a
57 transmissão pela picada do inseto, e como a leishmaniose visceral canina (LVC) é uma
58 doença de evolução crônica, nas áreas endêmicas em que a transmissão não é contínua a
59 infecção do cão pode persistir de uma época de transmissão até a época seguinte
60 (Abranches et al., 1998).

61 Estudos epidemiológicos são de fundamental importância para o
62 estabelecimento de metas para o controle da leishmaniose nas áreas endêmicas. O
63 município de Raposa-MA, uma área de urbanização recente, agrega vários fatores que
64 poderiam favorecer a manutenção da doença, o que de fato tem acontecido como
65 mostram os dados de infecção humana (Caldas et al., 2001) e canina (Garcia, 2004). O
66 objetivo deste trabalho foi atualizar os dados referentes a LVC na localidade de Vila
67 Nova, situada no município de Raposa-MA.

68

69 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

70

71 **2.1. Área de estudo**

72

73 O estudo foi realizado na localidade Vila Nova do município de Raposa – MA,
74 que apresenta uma área de 64km² com uma população de 20.698 habitantes distribuídos
75 em 42 localidades e fica localizado a 28 km de São Luís, capital do Estado do Maranhão
76 (IBGE, 2005).

77

78 **2.2. Censo dos animais e coleta de sangue**

79

80 Nos meses de fevereiro a abril de 2005 foi realizado o censo dos cães
81 domiciliados na localidade, bem como a coleta de 5ml de sangue desses animais, após o
82 devido consentimento do proprietário do animal. Após coagulação, à temperatura
83 ambiente, o soro foi separado por centrifugação a 1500rpm por 10 minutos, identificado
84 e estocado a -20°C até o momento dos ensaios.

2.3. ELISA para detectar anticorpos IgG anti-*Leishmania*

85
86
87 As placas de microtitulação (Limbro/Titertek) foram sensibilizadas com
88 antígeno de *Leishmania* na concentração de 10µg/ml (100µl/poço), diluído em tampão
89 carbonato-bicarbonato (pH 9,6), e incubadas a 37°C por 1h. Após a incubação foram
90 lavadas 3 vezes com PBS Tween a 0,05% e bloqueadas (250µl/poço) com PBS Tween
91 0,1%, e novamente incubadas a 4°C overnight. Após nova lavagem, os soros dos
92 animais da área juntamente com o soro dos cães controles positivos e negativos que
93 haviam sido previamente diluídos (1/400) em PBS Tween 0,05% foram adicionados
94 (100µl/poço) nas placas e incubados por 1h a 37°C. Após lavagem foi adicionado o
95 conjugado anti-IgG-fosfatase (SIGMA Chemical Company, St Louis, MO, USA)
96 específico para cão diluído em PBS Tween 0,05% (1/2000 – 100µl/ poço). As placas
97 foram novamente incubadas a 37°C por 1h, e após mais um ciclo de lavagem, foi
98 adicionado o substrato (p-nitrofenil fosfato – 1mg/ml – SIGMA) diluído em tampão
99 carbonato-bicarbonato (pH 9,6) para revelar. Após 15 minutos a reação foi interrompida
100 pela adição de NaOH 3M (50µl/poço). A leitura foi feita em espectrofotômetro
101 automático, utilizando-se a luz visível no comprimento de onda de 405nm. O cut-off foi
102 obtido calculando-se a média dos controles negativos mais dois desvios-padrão (Garcia,
103 2004).

104 **3. RESULTADOS**

105

106 Foram localizados 233 cães domiciliados na localidade, sendo 123 machos
107 (52,8%) e 110 fêmeas (47,2%).

108 Os títulos dos anticorpos IgG expressos em densidade ótica (D.O.) mostram que

109 a média dos valores das amostras ($0,041 \pm 0,065$) ficou mais próxima da média do

110 controle negativo (CN) ($0,035 \pm 0,007$), que da média do controle positivo (CP) ($0,393$

111 $\pm 0,032$). Entretanto, houve uma grande dispersão dos valores, alguns inclusive maiores

112 que a média do controle positivo (Figura 1).

113 Baseados no cut-off estabelecido, o qual foi de 0,0533, foram encontrados 69

114 cães com sorologia positiva, constituindo uma soroprevalência para LVC de

115 aproximadamente 29,6%. Dos cães positivos, 40 eram machos (58%) e 29 eram fêmeas

116 (42%) (Figura 2).

117

118 **4. DISCUSSÃO**

119

120 A leishmaniose visceral já foi considerada uma doença tipicamente silvestre,

121 característica de ambientes rurais, que sofreu nas últimas décadas uma mudança do seu

122 perfil epidemiológico, fundamentalmente causada por modificações sócio-ambientais,

123 como o desmatamento e o processo migratório de populações humana e canina

124 originárias de áreas rurais, onde a doença é endêmica. Além disso, o crescimento

125 desordenado das cidades levando à destruição do meio ambiente, associado ao aumento

126 da crise social, têm sido apontados como os principais fatores promotores das condições

127 adequadas para ocorrência da LV na área urbana (Fundação Nacional de Saúde, 2002).

128 Em localidades onde a LV é endêmica, o cão (*Canis familiaris*), como
129 hospedeiro doméstico, tem sido considerado o principal reservatório de *L. chagasi* no
130 ciclo de transmissão para o homem nos centros urbanos (França-Silva et al., 2003).

131 Neste estudo, o índice de cães machos infectados foi 1,4 vezes maior que o de
132 fêmeas, indicando uma pequena prevalência de cães do sexo masculino (Figura 2). Este
133 resultado não deve estar relacionado a uma maior susceptibilidade dos machos, mas
134 provavelmente deve-se ao fato de que os machos, mesmo sendo domiciliados, são mais
135 errantes que as fêmeas, ficando não raras vezes, mais expostos aos flebotomíneos.

136 Um estudo realizado em 2004 nas localidades Vila Nova e Vila Bom Viver do
137 município de Raposa-MA, encontrou para as duas vilas a soroprevalência de 39,71%
138 inicialmente e sete meses após 32,6% (Garcia, 2004), mas com uma perda considerável
139 da amostra inicial. Em nosso trabalho encontramos uma soroprevalência de 29%, este
140 dado mostra que a infecção canina, apesar de indicar um pequeno decréscimo, ainda
141 persiste naquela região.

142 Estudos realizados em São José de Ribamar, um outro município da ilha de São
143 Luís, encontraram soroprevalências diferentes de acordo com a vila estudada, variando
144 de 64% (Melo et al., 2002) a 21% (Guimarães et al., 2005). As soroprevalências
145 encontradas por Guimarães et al. (2005) nas vilas Quinta 21% e Sérgio Tamer 25%,
146 estão próximas à encontrada em nosso trabalho na localidade Vila Nova no município
147 de Raposa.

148 Outros estudos sobre a soroprevalência da leishmaniose canina no Brasil
149 mostram valores muito variáveis como os encontrados por Monteiro et al. (2005) com
150 4,9% em Montes Claros, MG; Nunes et al. (2001) em Bonito MS, 23,7%; Paranhos-
151 Silva et al. (1996) com uma taxa de 23,5% em Jequié, BA; Galimberti et al. (1999) com
152 26,3% em Araçatuba, SP; Santos et al. (1998) encontrou 24% em Corumbá e Ladário,

153 MS; Guerra et al. (2004) com 10,3% em uma aldeia indígena no estado de Roraima e
154 Cabrera et al. (2003) encontrando 25% em Barra de Guaratiba, RJ.

155 A percentagem de cães infectados morando em área onde a leishmaniose canina
156 é endêmica tem grandes implicações na saúde pública, pois autores como Molina et al.
157 (1994) demonstraram que cães infectados, mas assintomáticos, eram fontes de parasitas
158 para flebotomíneos e como consequência desempenham um papel ativo na transmissão
159 da doença para humanos e na manutenção da mesma nos hospedeiros caninos.

160 Na localidade Vila Nova, podemos detectar alguns fatores de risco que podem
161 ser os responsáveis por promover as condições adequadas à instalação e à manutenção
162 da infecção, tais como: no censo realizado o número de cães detectados mostrou que na
163 localidade haviam 233 cães domiciliados, entretanto o número de cães não-domiciliados
164 é desconhecido; este dado associado ao fato da localidade possuir pouca infra-estrutura
165 urbana, e a intensa ocupação humana na área, além do desmatamento da vegetação
166 natural para a criação de novas vilas poderiam contribuir para o estabelecimento de
167 hábitos peridomésticos do flebotomíneo vetor e de mamíferos e roedores silvestres que
168 estão sempre envolvidos no ciclo da leishmaniose. Além disso, a taxa de soros caninos
169 reagentes, detectados na localidade (29,6%), associada à infecção humana previamente
170 relatada (Caldas et al., 2001), podem explicar a manutenção da localidade Vila Nova
171 como uma área endêmica para leishmaniose.

172 Com isso, verifica-se que caso medidas para o controle da leishmaniose canina
173 não sejam tomadas urgentemente na área, a infecção canina persistirá e poderá levar, em
174 um breve período de tempo, a uma situação epidêmica da doença também em humanos,
175 causando um grave problema de saúde pública nesta região já tão carente de serviços de
176 saúde.

177 AGRADecIMENTOS

178 Ao CNPq pelo auxílio financeiro (Proc. nº 620081/2004-0 ACT), pelas bolsas de
179 pesquisador para J.M. Costa e A. Barral; de doutorado para R.B.B.Gomes, e de
180 mestrado para L.A. Silva. A FAPEMA pelas bolsas de mestrado de J. F. Almeida, C. C.
181 Carvalho. Ao TMRC pela bolsa de pesquisa para F. R. F. Nascimento.

182 **REFERÊNCIAS**

183

184 Abranches, P., Campino, L., Santos-Gomes, G.M. 1998. Leishmaniose canina: novos
185 conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da
186 leishmaniose visceral humana. Acta Med Portuguesa. 11: 871-875.

187 Ashford, R.W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int. J.
188 Parasitol. 30:1269-1281.

189 Cabrera, M.A.A., Paula, A.A., Camacho, L.A.B., Marzochi, M.C.A., Xavier, S.C.,
190 Silva, A.V.M., Jansen, A.M.A. 2003. Canine visceral leishmaniasis in Barra de
191 Guaratiba, Rio de Janeiro Brazil: assessment of risk factors. Rev. Inst. Med. Trop.
192 São Paulo 45, 79–83.

193 Caldas, A.J.M., Silva, D.R.C., Pereira, C.C.R., Nunes, P.M.S., Silva, B.P., Silva,
194 A.A.M., Barral, A., Costa, J.M.L. 2001. Infecção por *Leishmania (Leishmania)*
195 *chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na
196 Ilha de São Luis – MA, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34 (5):445-451.

197 França-Silva, J.C., Costa, R.T., Siqueira, A.M., Machado-Coelho, G.L.L., Mayrink, W.,
198 Vieira, E.P., Costa, J.C., Genaro, O., Nascimento, E. 2003. Epidemiology of canine
199 visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas
200 Gerais State, Brazil. Vet. Parasitol. 111:161-173.

201 Fundação Nacional de Saúde. 2002. Leishmaniose visceral no Brasil: situação atual,
202 principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. Boletim
203 eletrônico epidemiológico 6.

204 Garcia, A.M. 2004. Estudo da infecção e doença no cão (*Canis familiaris*) *Leishmania*
205 (*Leishmania*) *chagasi* em uma área endêmica na ilha de São Luís-Maranhão, Brasil.

206 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão – Mestrado em Saúde
207 e Ambiente. São Luís, MA. 101p.

208 Galimbertti, M.Z., Katz, G., Camargo-Neves, V.L.F., Rodas, L.A.C., Casanova, C.,
209 Costa, A.I., Araujo, M.F.L., Taniguchi, H.H., Barbosa, J.A.R., Barbosa, J.E.R.,
210 Tolezano, J.E., Pinto, P.L.S. 1999. Leishmaniose visceral americana no Estado de
211 São Paulo. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 32 (supl I): 217.

212 Gramiccia, M., Gradoni, L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and
213 approaches to disease control. Int. J. Parasitol. 35: 1169-1180.

214 Guerra, J.A.O., Barros, M.L.B., Fé, N.F., Guerra, M.V.F., Castellon, E., Paes, M.G.,
215 Sherlock, I.A. 2004. Leishmaniose visceral entre índios no estado de Roraima
216 Brasil. Aspectos clínicoepidemiológicos de casos observados no período de 1989 a
217 1993. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 37, 305– 311.

218 Guimarães, K.S., Batista, Z.S., Dias, E.L., Guerra, R.M.S.N.C., Costa, A.D.C., Oliveira,
219 A.S., Calabrese, K.S., Cardoso, F.O., Souza, C.S.S., Zaverucha do Vale, T.,
220 Gonçalves da Costa, S.C., Abreu-Silva, A.L. 2005. Canine visceral leishmaniasis in
221 São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. Vet. Parasitol. 131: 305-309.

222 Herwaldt, B.L. 1999. Leishmaniasis. Lancet 354, 1191–1199.

223 IBGE. 2005. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Dados e mapas das cidades
224 brasileiras. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>.

225 Melo, F.A., Pereira, J.G., Calabrese, K.S., Abreu-Silva, A.L. 2002. Seroprevalence of
226 canine visceral leishmaniasis and Chagas disease in Vila São José - São José de
227 Ribamar. Maranhão State. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 12 (Suppl.), 130.

228 Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andreas, M., Gonzalez, F., Castillo, J.A.,
229 Lucientes, J., Alvar, J. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania*

230 *infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.
231 88: 491-493.

232 Monteiro, E.M., Silva, J.C.F., Costa, R.T., Costa, D.C., Barata, R.A., Paula, E.V.,
233 Machado-Coelho, G.L.L., Rocha, M.F., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S. 2005.
234 Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes
235 Claros, Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38. 2.

236 Moreno, J., Alvar, J. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the
237 experimental model. Trends in Parasitol. 18. 9. 399-405.

238 Nunes, V.L.B., Galati, E.A.B., Nunes, D.B., Zinezzi, R.O., Savani, E.S.M.M., Ishikawa,
239 E., Camargo, M.C.G.O., D'áuria, S.R.N., Cristaldo, G., Rocha, H.C. 2001.
240 Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de
241 Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34. 3.

242 Paranhos-Silva, M., Freitas, L.A.R., Santos, W.C., Grimaldi, G.J., Pontes-de-Carvalho,
243 L.C., Oliveira-dos-Santos, A.J. A. 1996. Cross-sectional serodiagnostic survey of
244 canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 55: 39-44.

245 Santos, S.O., Arias, J., Ribeiro, A.A., Hoffmann, M.P., Freitas, R.A., Malacco, M.A.F.
246 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral
247 Leishmaniasis. Med. Vet. Entomol. 12: 315-317.

248 Tafuri, W. L., Oliveira, M. R., Melo, M. N., Tafuri, W. L. 2001. Canine visceral
249 leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from
250 Brazil. Vet. Parasitol. 96: 203–212.

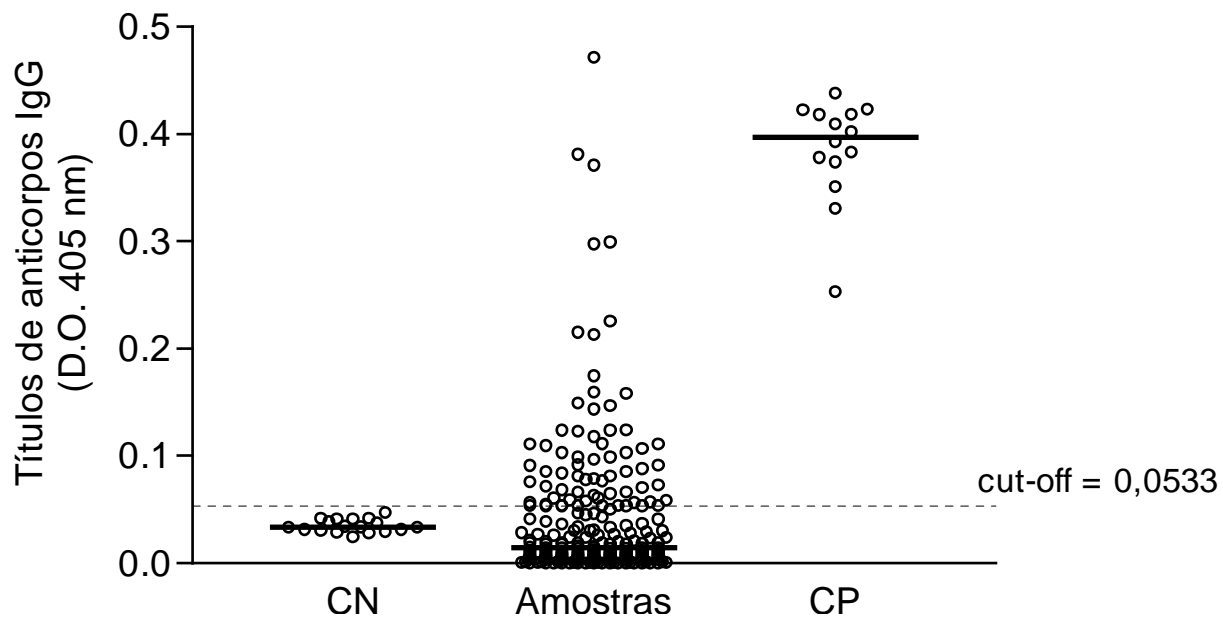


Figura 1 - Títulos séricos de anticorpos IgG anti-*Leishmania* expressos em densidade óptica (D.O.) nos controles negativos (CN), controles positivos (CP) e nas amostras. (—) Mediana

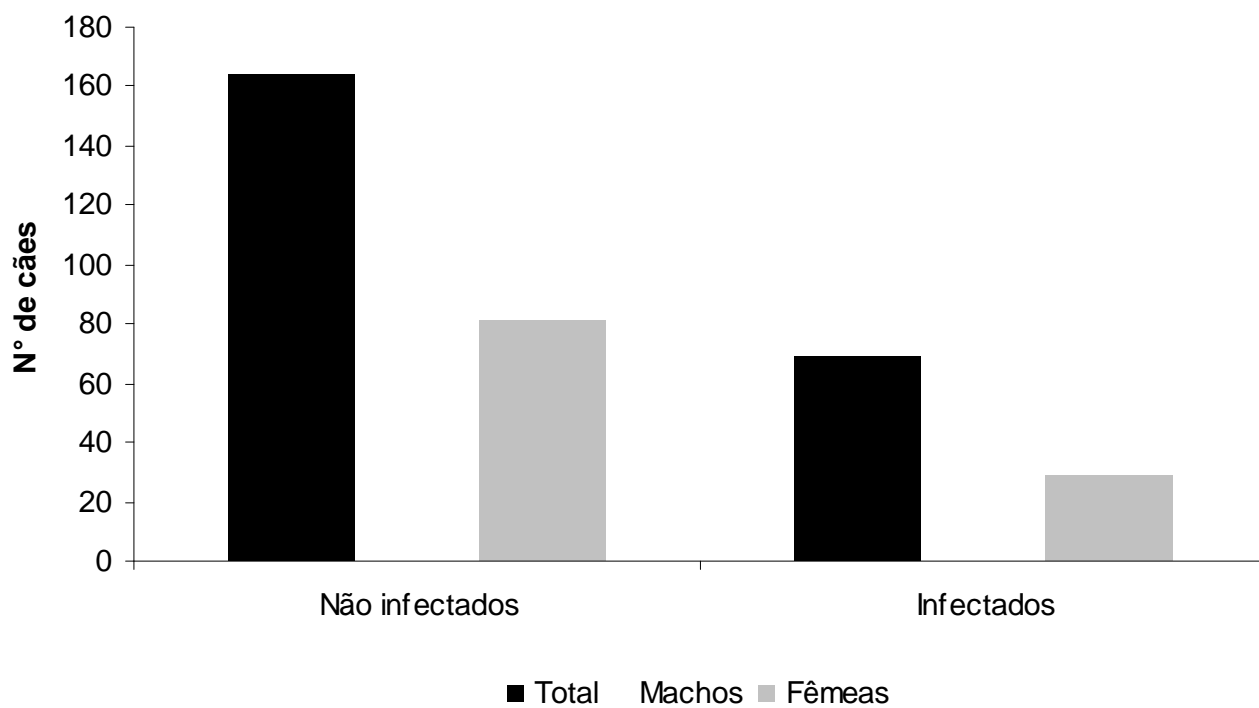


Figura 2 – Número de cães machos e fêmeas infectados e não–infectados por *Leishmania chagasi*.

ARTIGO 2

1 **IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania chagasi*: Uma correlação controversa com os sinais**
2 **clínicos do calazar canino.**

3 João F Almeida¹, Cristiane C. Carvalho², Lucilene A. Silva¹, Arnaldo M.Garcia³, Maria
4 RA. Soares², Dirceu J.Costa⁴, Sanara M. Sousa¹, Silma R.F.Pereira², Jackson M. Costa⁴,
5 José M. M. Rebêlo⁵, Aldina Barral^{4,6}, Flávia R.F. Nascimento^{1*}.

6
7 ¹Laboratório de Imunofisiologia, Departamento de Patologia, Universidade Federal
8 do Maranhão, Av. dos Portugueses, s/n, Campus do Bacanga, 65085-580, São Luís, MA,
9 Brasil.

10 ²Laboratório de Genética, Departamento de Biologia, Universidade Federal do
11 Maranhão, Av. dos Portugueses, s/n, Campus do Bacanga, 65085-580, São Luís, MA,
12 Brasil.

13 ³Secretaria Municipal de Saúde - Vigilância Sanitária Municipal, São Luís – MA,
14 Brasil.

15 ⁴Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-BA.

16 ⁵Laboratório de Entomologia e Vetores, Departamento de Biologia, Praça da Madre Deus,
17 São Luís, MA, Brasil, 65025-580.

18 ⁶Immunology Investigation Institute, São Paulo, São Paulo, Brasil.

19
20 ***Corresponding author:** Flávia Nascimento

21 Postal Address: Rua Olavo Bilac, 138 Monte Castelo

22 CEP 65035-480

23 São Luís, MA, Brazil

24 Phone: 55 98 32178548

25 E-mail: nascimentoofrf@yahoo.com.br

26 **Resumo**

27

28 As subclasses de IgG (IgG1 e IgG2) têm sido relatadas por vários autores como
29 prováveis marcadores da evolução da leishmaniose visceral canina. Neste trabalho, além
30 de verificarmos esta hipótese tentamos correlacionar os níveis sorológicos das
31 subclasses com o número de sinais clínicos apresentados pelos cães nas respectivas
32 fases clínicas da doença. Os dados encontrados na literatura são muito conflitantes
33 apresentando por vezes resultados contrários aos encontrados neste trabalho com
34 relação ao comportamento das subclasses entre cães sintomáticos e assintomáticos. Foi
35 encontrada correlação positiva aproximando-se de nula para IgG, negativa para IgG1 e
36 positiva (0,48) apesar de considerada regular para IgG2.

37

38 *Palavras chave:* leishmaniose visceral canina, IgG, sinais clínicos.

39 1. INTRODUÇÃO

40
41 Leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero
42 *Leishmania*, parasitas os quais infectam células do sistema mononuclear fagocítico de
43 numerosas espécies de mamíferos, incluindo humanos. As leishmanioses são
44 transmitidas ao homem principalmente pela picada de flebotomíneos do gênero
45 *Lutzomyia* nas Américas e pelo gênero *Phlebotomus* na Europa, Ásia e África
46 (Gramiccia et al., 2005).

47 Nas Américas Central e do Sul, incluindo o Brasil, a leishmaniose visceral
48 americana é causada pela *Leishmania chagasi* (Herwaldt, 1999). Observa-se,
49 atualmente, um incremento anual da ordem de mil novos casos de leishmaniose visceral
50 humana em áreas endêmicas do nordeste do Brasil, onde também ocorre uma alta
51 prevalência de leishmaniose visceral canina, tornando os cães domésticos os principais
52 reservatórios no ciclo de vida urbano do parasita *Leishmania chagasi* (Franke et al.,
53 2002).

54 A leishmaniose visceral canina é uma doença debilitante em que se observa uma
55 resposta canina diferenciada, onde muitos dos animais infectados são susceptíveis e
56 desenvolvem uma doença ativa, que é caracterizada por altos títulos de anticorpos anti-
57 *Leishmania* e habilidade linfoproliferativa deprimida; enquanto outros animais chegam
58 a cura espontânea sem demonstrar sinais patentes da doença (Pinelli et al., 1994). A
59 doença canina é caracterizada por lesões na pele, dermatite, linfadenopatia
60 generalizada, ceratoconjuntivite, diarreia e onicogribose (Lima et al., 2003).

61 Ambas as leishmanioses, visceral canina e visceral humana, compartilham
62 muitas características e sinais clínicos. Dessa forma, o estudo da evolução da doença
63 nos cães tem trazido muitas informações a respeito do desenvolvimento da infecção e

64 dos mecanismos imunológicos envolvidos na resistência ou susceptibilidade a esse
65 protozoário parasita (Moreno et al., 2002).

66 Na tentativa de encontrar marcadores imunológicos que indiquem o estágio da
67 doença e ainda sirvam como prognóstico para possíveis tratamentos, muitos
68 pesquisadores têm estudado a resposta imune humoral dos cães com LVC. Deplazes et
69 al (1995) lançaram a hipótese de que as subclasses de IgG teriam um papel importante
70 como marcadores da infecção sintomática e assintomática em cães. Desde então,
71 diversas pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de entender o aparente papel
72 dicotômico dos isotipos de IgG na progressão da infecção (Bourdoiseau et al.,1997;
73 Nieto et al., 1999; Leandro et al., 2001; Solano-Gallego et al., 2001; Quinnell et al.,
74 2003; Almeida et al., 2005; Reis et al., 2006). Entretanto, os resultados obtidos têm sido
75 bastante controversos. Seguindo esta linha de estudos, o objetivo deste trabalho foi
76 correlacionar os níveis sorológicos de IgG e de suas subclasses IgG1 e IgG2 com os
77 sinais clínicos apresentados por cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.

78

79 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

80

81 **2.1. Área de estudo**

82 A localidade Vila Nova, situada no município de Raposa, estado do Maranhão –
83 Brasil, é o local de origem dos cães que participaram deste estudo. O município teve sua
84 fundação na década de 1990 e consistia basicamente em uma vila de pescadores, mas
85 nos últimos anos tem se tornado uma área de intenso povoamento e atualmente novas
86 vilas são criadas naquele município sem qualquer infra-estrutura, desmatando e
87 avançando em áreas de mata antes não exploradas. O município de Raposa apresenta
88 uma área de 64km² com uma população de aproximadamente 20.698 habitantes

89 distribuídos em 42 localidades. É um dos quatro municípios que compõem a ilha de São
90 Luís, e localiza-se a aproximadamente 28km da capital do Estado do Maranhão (IBGE,
91 2005).

92

93 **2.2. Cães e desenho do estudo**

94 Inicialmente foi realizado um censo na localidade de Vila Nova, onde detectou-
95 se a presença de 233 cães domiciliados. Destes, 69 apresentaram título de IgG anti-
96 *Leishmania* positivos, constituindo uma soroprevalência de 29% (Almeida et al.,
97 manuscrito em preparação).

98 Após 4 meses da primeira visita a localidade de Vila Nova foi realizada uma
99 nova coleta de sangue. Dos 69 cães anteriormente positivos para *Leishmania*, foram
100 localizados apenas 27 animais, tendo-se uma perda de 61%. Os animais não localizados
101 morreram, fugiram ou se mudaram junto com seus donos para outras localidades.

102 Dessa forma, a amostra deste estudo foi constituída de 27 cães domiciliados em
103 Vila Nova e soropositivos para *Leishmania chagasi* pelo teste de ELISA. Oito cães não-
104 infectados, obtidos em clínicas veterinárias de áreas não endêmicas e sorologicamente
105 negativos, foram incluídos como grupo controle.

106

107 **2.3. Avaliação Clínica**

108 Os 27 animais localizados foram capturados e encaminhados para o Centro de
109 Controle de Zoonoses. Neste local foi realizada a avaliação clínica dos animais por um
110 médico veterinário, o qual adotou uma classificação da LVC de acordo com os critérios
111 propostos por Mancianti et al. (1988), Molina et al. (1994) e também aqueles adotados
112 no manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral do Ministério da Saúde
113 (2003). Dessa forma, os animais foram classificados em:

114 Assintomáticos: cães sem sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*
115 (cães que apresentavam apenas onicogrifose não foram classificados como
116 sintomáticos).

117 Oligossintomáticos: cães com sinais moderados incluindo dois sinais da doença,
118 tais como, aumento dos linfonodos e onicogrifose, perda de peso e pêlos opacos.

119 Polissintomáticos: todos ou alguns sinais mais comuns incluindo 3 ou mais
120 sinais da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras,
121 hiperqueratose), onicogrifose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paralisia dos
122 membros caudais.

123 Após a avaliação clínica e o devido consentimento do proprietário do animal,
124 foram coletados 5ml de sangue periférico de cada animal e após a retração do coágulo, o
125 soro foi separado por centrifugação a 1500rpm por 10 minutos e estocado a -20°C
126 até o momento dos ensaios.

127

128 2.4. Quantificação de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania*.

129 Anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* foram detectados no soro dos
130 animais pelo método de ELISA. As placas de microtitulação (Limbro/Titertek) foram
131 sensibilizadas com antígeno de *Leishmania* na concentração de 10µg/ml (100µl/poço),
132 diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6), e incubadas a 37°C por 1h. Após a
133 incubação foram lavadas 3 vezes com PBS Tween a 0,05% e bloqueadas (250µl/poço)
134 com PBS Tween 0,1%, e novamente incubadas a 4°C overnight. Após três lavagens com
135 PBS Tween 0,05% os soros dos animais da área juntamente com o soro dos cães
136 controles positivos e negativos que haviam sido previamente diluídos (1/400) em PBS
137 Tween 0,05% foram adicionados (100µl/poço) nas placas e incubados por 1h a 37°C.

138 Após um ciclo de lavagens, foram adicionados a cada placa os conjugados
139 específicos para cão anti-IgG-fosfatase alcalina (SIGMA Chemical Company, St Louis,
140 MO, USA), anti-IgG2-fosfatase (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) e
141 anti-IgG1-peroxidase (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) diluído em
142 PBS Tween 0,05% (1/2000, 100µl/poço). As placas foram incubadas a 37°C por 1h.

143 Após outro ciclo de lavagem foi adicionado 1mg/ml do substrato p-nitrofenil
144 fosfato (SIGMA Chemical Company, St Louis, MO, USA) diluído em tampão
145 carbonato-bicarbonato (pH 9,6) para revelar as placas com anti-IgG/fosfatase e anti-
146 IgG2/fosfatase. A reação foi interrompida 15 minutos depois pela adição de NaOH 3M
147 (50µl/poço) e a leitura realizada a 405nm.

148 No caso do conjugado anti-IgG1/peroxidase foi adicionado o substrato
149 tetrametilbenzidina (SIGMA) diluído em 9 ml de tampão citrato fosfato (pH 5,0)
150 acrescido de 1mL de DMSO (Sigma) e 2µl de H₂O₂. Após 5 minutos a reação foi
151 interrompida com 50µl de H₂SO₄ 8N e a leitura foi realizada a 450nm. O cut-off foi
152 obtido calculando-se a média dos controles negativos mais dois desvios-padrão.

153 Os resultados foram expressos em densidade óptica ou em índice de aumento. O
154 índice de aumento foi calculado levando-se em consideração as D.O. individuais
155 divididas pela média do grupo controle negativo para cada uma das análises.

156

157 2.5. *Análise estatística*

158 As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 3.0
159 (GraphPad Software Inc.). O teste de análise de variância ANOVA One-way, foi
160 utilizado para os estudos comparativos das médias dos valores de absorbância entre os
161 grupos de cães infectados e o grupo controle. A correlação *r* de Pearson foi utilizada
162 para avaliar a correlação entre os sinais clínicos e os valores de absorbância de IgG,

163 IgG1 e IgG2. Em todos os casos os resultados foram considerados significantes quando,
164 $p \leq 0.05$. Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão ou
165 mediana das densidades ópticas ou dos índices de aumento dos grupos infectados em
166 relação ao controle negativo, conforme o caso.

167

168 **3. RESULTADOS**

169

170 **3.1. Análise clínica dos cães**

171 A análise clínica dos 27 cães revelou que 37,1% eram assintomáticos (n=10),
172 29,6% eram oligossintomáticos (n=8) e 33,3% eram polissintomáticos (n=9).

173 O sinal clínico mais freqüente nos cães oligossintomáticos foi linfadenopatia,
174 presente em 75% destes (n=6). Os outros sinais, também presentes, foram: onicogribose
175 em 4 cães (50%), úlceras em 2 cães (25%), uveíte em 1 cão (12,5%) e alopecia em 1 cão
176 (12,5%).

177 Por outro lado, nos cães polissintomáticos, o sinal clínico mais freqüente foi
178 onicogribose, presente em 100% dos animais (n=9). A perda de peso e as alterações
179 cutâneas diversas (alopecia, úlceras, hiperqueratose, uveíte, eczema furfuráceo) também
180 foram muito comuns, presentes em 77,8% dos cães (n=7), sendo que cada cão possuía
181 pelo menos duas alterações cutâneas. A linfadenopatia foi o quarto sinal clínico mais
182 freqüente, presente em 66,7% dos animais (n=6). Finalmente, ceratoconjuntivite foi
183 observada em 22,2 % dos animais (n=2) (Tabela 1).

184 3.2. Anticorpo IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG2) anti-*Leishmania*

185

186 Como era de se esperar, a produção de anticorpos da classe IgG específicos para
187 *Leishmania* foi maior nos grupos de cães infectados em relação ao controle não-
188 infectado. Entretanto, não houve diferença na produção deste anticorpo entre os grupos
189 infectados (Figura 1A).

190 A produção da subclasse IgG1 anti-*Leishmania* foi maior nos animais infectados
191 quando comparado com o controle negativo. Entretanto, não houve diferença entre os
192 grupos infectados (Controle Negativo – CN: $0,011 \pm 0,008$; Assintomático – Ass.: $0,148$
193 $\pm 0,085$; Oligossintomático - Olig.: $0,158 \pm 0,046$; Polissintomático - Poli.: $0,149 \pm$
194 $0,081$)(Figura 1 B).

195 Em relação a subclasse IgG2, a produção também foi maior nos animais
196 infectados em relação ao controle negativo, porém apenas o grupo polissintomático
197 apresentou aumento na produção desse anticorpo quando comparado ao grupo
198 assintomático (CN: $0,004 \pm 0,004$; Ass.: $0,042 \pm 0,027$; Olig.: $0,059 \pm 0,055$; Poli:
199 $0,110 \pm 0,068$) (Figura 1C).

200 A correlação entre o número de sinais clínicos e os valores de densidade ótica de
201 IgG, IgG1 e IgG2 avaliada pela correlação r de Pearson mostrou-se positiva mas quase
202 nula para IgG ($r = 0,04592$, $p = 0,8201$), negativa para IgG1 ($r = -0,01128$, $p = 0,9555$)
203 e positiva, mas regular, para IgG2 ($r = 0,4830$, $p = 0,0107$). O diagrama de dispersão
204 para os valores de D.O. para os anticorpos é mostrado na figura 2.

205 Quando se avaliou o índice de aumento da produção dos anticorpos IgG, IgG1 e
206 IgG2 anti-*Leishmania* em relação ao controle negativo, foi observado que houve uma
207 tendência de aumento na média de IgG à medida que a infecção progrediu, enquanto a
208 média da IgG1 apresentou tendência inversa. Entretanto, as diferenças entre os grupos

209 não foram significativas. Por outro lado, a produção média de IgG2 foi
210 significativamente maior nos animais polissintomáticos em relação aos cães
211 assintomáticos e oligossintomáticos (Figura 3).

212 A análise individual do índice de aumento da produção de anticorpos
213 demonstrou que a produção de IgG, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* apresentou uma curva
214 de Gauss com distribuição normal em todos os grupos. Não houve diferença entre os
215 grupos em relação a IgG e IgG1, porém, houve diferença significativa em relação a
216 IgG2, que foi produzida em maior quantidade pelos cães polissintomáticos,
217 confirmando os resultados obtidos na correlação (Figura 4).

218

219 **4. DISCUSSÃO**

220

221 A leishmaniose visceral canina é uma doença debilitante que pode se apresentar
222 completamente assintomática ou com múltiplos sinais aparentes. Na forma
223 assintomática. Pode muitas vezes passar despercebida, uma vez que os cães infectados
224 podem apresentar aspecto saudável. Alguns autores têm questionado o papel dos cães
225 assintomáticos como reservatórios domésticos de *Leishmania chagasi*. Entretanto, cães
226 assintomáticos podem apresentar parasitas na sua pele sadia (Abranches et al., 1991;
227 Fisa et al., 1999), o que reforça o conceito vigente de que cães assintomáticos podem ter
228 um papel importante na manutenção da doença e na sua ressurgência em áreas onde a
229 mesma era reconhecida como controlada (Abranches et al., 1998).

230

231 Em comunidades endêmicas para leishmaniose é de se esperar que a maioria dos
232 animais infectados seja assintomática, o que de fato foi demonstrado por Marzochi et al.
233 (1985), Guimarães et al. (2005) e Garcia (2004), sendo que este também fez seu estudo
no município de Raposa (localidades Vila Nova e Bom Viver). Estes trabalhos

234 encontraram em torno de 60% de cães assintomáticos. Entretanto, outros estudos têm
235 demonstrado que este padrão não é real para todas as comunidades situadas em áreas
236 endêmicas. Em nosso estudo, por exemplo, apenas 37% dos cães avaliados eram
237 assintomáticos, um percentual próximo ao encontrado por Mancianti et al. (1988) e Fisa
238 et al. (1999), que encontraram 45% e 35% de assintomáticos, respectivamente. Estes
239 dados podem sugerir um comportamento epidemiológico diferenciado para a infecção
240 canina, dependendo do momento em que se realiza o estudo, tempo de infecção, do
241 estado geral do cão (nutricional, imunológico, co-infecções) e da eficiência das medidas
242 de controle da leishmaniose.

243 Ainda não é muito claro na literatura como ocorre a progressão dessa infecção e
244 quais os fatores imunogenéticos que determinam a susceptibilidade ou resistência desses
245 animais à infecção. A ausência de clareza nesse aspecto deve-se em grande parte ao fato
246 de que os animais soropositivos devem ser eliminados para que não haja a manutenção
247 da infecção no local, o que impede o acompanhamento, em longo prazo, destes animais.
248 Se isso fosse possível, poderia ser investigado se o grande número de assintomáticos
249 encontrado em alguns estudos estaria relacionado com infecções recentes, ou com uma
250 condição de equilíbrio alcançada entre o parasita e o hospedeiro, ou ainda, com um
251 longo período de incubação latente da infecção (Fisa et al., 1999).

252 Neste trabalho, o sinal clínico mais freqüente nos cães oligossintomáticos foi
253 linfadenopatia, seguida de onicogribose e úlceras, enquanto nos cães polissintomáticos,
254 a onicogribose foi a mais freqüente, seguida de alterações na pele, caquexia e
255 linfadenopatia. Garcia (2004), trabalhando na mesma área (localidades Vila Nova e
256 Bom Viver) do município de Raposa-MA, encontrou para cães infectados sintomáticos
257 onicogribose como o sinal clínico mais freqüente seguido de lesões de pele e
258 linfadenopatia. Estes dados referentes à mesma área, mas em momentos diferentes,

259 estão de acordo com os trabalhos de Abranches et al. (1991), Nieto et al. (1999),
260 Solano-Gallego et al. (2001) e Almeida et al. (2005), porém contrasta com o observado
261 por Guimarães et al. (2005) os quais encontraram lesões de pele como o sinal mais
262 freqüente. Os últimos autores sugerem que *L. chagasi* poderia, primariamente, induzir
263 lesões cutâneas e só depois disseminar para os órgãos internos, hipótese que poderia ser
264 sustentada por Reis et al. (2006) que demonstraram haver maior densidade parasitária
265 na pele, mesmo na fase assintomática. Entretanto, em nosso estudo a linfadenopatia
266 precedeu as alterações na pele, uma vez que cães oligossintomáticos apresentaram, na
267 sua maioria, linfonodos enfartados.

268 As evidências de que na leishmaniose visceral existe um comprometimento
269 imunocelular acentuado, enquanto a resposta imune humoral permanece ativa com
270 produção alta de anticorpos específicos levaram os pesquisadores a investigar se a
271 susceptibilidade dos cães estaria relacionada a sua capacidade de produzir ou não
272 determinado tipo de imunoglobulinas. Há uma década, grande enfoque tem sido dado
273 para as subclasses de IgG, especificamente IgG1 e IgG2. Entretanto, os resultados
274 obtidos têm sido altamente controversos.

275 Os dados de IgG1 e IgG2 encontrados em nosso estudo mostram que os níveis
276 de IgG1 foram maiores que o encontrado no controle negativo, porém semelhantes para
277 assintomáticos e sintomáticos (oligossintomáticos e polissintomáticos). Por outro lado,
278 os níveis de IgG2 nos polissintomáticos foram significativamente maiores que os níveis
279 dos cães do grupo controle e também dos assintomáticos. Resultados semelhantes foram
280 encontrados por Leandro et al. (2001) e Reis et al. (2006) em diferentes modelos de
281 infecção. Leandro et al. (2001), utilizando cães experimentalmente infectados com *L.*
282 *infantum* demonstraram que a produção de IgG1 anti-*Leishmania* é similar nos cães
283 assintomáticos e sintomáticos. À mesma conclusão chegaram Reis et al. (2006) em um

284 trabalho bastante elegante utilizando cães naturalmente infectados com *L. chagasi*.
285 Entretanto, Deplazes et al. (1995) e Nieto et al. (1999), utilizando modelo de infecção
286 experimental de cães com *L. infantum*, encontraram em seus estudos correlação positiva
287 entre IgG1 e sintomáticos.

288 Em nosso estudo, a tentativa de correlacionar os valores de densidade óptica das
289 subclasses de IgG e o número de sinais apresentados pelos cães nas várias fases da
290 doença demonstrou correlação positiva somente para IgG2. Este dado reforça os
291 achados de Reis et al. (2006) os quais sugeriram que IgG2 está associada com a
292 morbidade pela LVC, sendo positivamente correlacionada com os mais severos sinais
293 clínicos da doença e a alta densidade parasitária. Entretanto, difere dos achados de
294 Deplazes et al. (1995) e Nieto et al. (1999) que encontraram correlação positiva entre
295 sinais e IgG1.

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

301 Quando os cães foram analisados de forma individual, considerando o índice de
302 aumento de IgG, IgG1 e IgG2 em relação aos seus respectivos controles negativos,
303 verificou-se que em todos os grupos sintomatológicos avaliados havia cães que
304 apresentavam uma resposta humoral muito baixa e outros que apresentavam resposta
305 humoral muito elevada indicando que não há um padrão único de resposta entre os
306 animais, nem mesmo quando eles se encontram na mesma fase clínica da infecção. Não
307 houve correlação individual entre as duas subclasses e nem entre o tipo de sinal clínico
308 apresentado e os níveis de anticorpos (dados não mostrados), o que sugere que a

309 produção de subclasses depende de um contexto imunológico onde o sinal clínico em si
310 é apenas uma das vertentes.

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

317

318 **AGRADECIMENTOS**

319 Ao CNPq pelo auxílio financeiro (Proc. nº 620081/2004-0 ACT), pelas bolsas de
320 pesquisador para J.M. Costa e A. Barral; de mestrado para L.A. Silva e de PIBIC para
321 S.M. Sousa. À Capes pela bolsa de doutorado de D.J.Costa. A FAPEMA pelas bolsas de
322 mestrado de J.F.Almeida, C.C.Carvalho, M.R.A.Soares. Ao TMRC pela bolsa de
323 pesquisa para F.R.F.Nascimento.

324 **REFERÊNCIAS**

325

326 Abranches, P., Santos-Gomes, G.M., Rachamin, N., Campino, L., Schnur, L.F., Jaffe,
327 C.L.L. 1991. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite*
328 *Immunol.* 13, 537–550.

329 Abranches, P., Campino, L., Santos-Gomes, G.M. 1998. Leishmaniose canina: novos
330 conceitos de epidemiologia e imunologia e seus reflexos no controlo da
331 leishmaniose visceral humana. *Acta Med Portuguesa.* 11:871-875.

332 Almeida, M.A.O., Jesus, E.E.V., Sousa-Atta, M.L.B., Alves, L.C., Berne, M.E.A., Atta,
333 A.M. 2005. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with
334 *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 151–158.

335 Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Hoareau, E., Boehringer, C., Stolle, T., Chabanne, L.
336 1997. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally
337 *Leishmania infantum* infected treated and untreated dogs. *Vet. Immunol.*
338 *Immunopathol.* 59, 21–30.

339 Deplazes, P., Smith, N.C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J. 1995. Specific IgG1 and IgG2
340 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite*
341 *Immunol.* 17, 451– 458.

342 Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M. J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego,
343 J., Portús, M. 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) The
344 example of Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83. 87-97.

345 Franke, C.R., Staubach, C., Ziller, M., Schlüter, H. 2002. Trends in the temporal and
346 spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia
347 Brazil from 1985 to 1999. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 236–241.

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

352 Gramiccia, M, Gradoni, L. 2005. The current status of zoonotic *Leishmaniases* and
353 approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35: 1169-1180.

354 Guimarães, K.S., Batista, Z.S., Dias, E.L., Guerra, R.M.S.N.C., Costa, A.D.C., Oliveira,
355 A.S., Calabrese, K.S., Cardoso, F.O., Souza, C.S.S., Zaverucha do Vale, T.,
356 Gonçalves da Costa, S.C., Abreu-Silva, A.L. 2005. Canine visceral leishmaniasis in
357 São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 131: 305-309.

358 Herwaldt, B.L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191–1199.

359 IBGE. 2005. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Dados e mapas das cidades
360 brasileiras. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>.

361 Leandro, C., Santos-Gomes, G.M., Campino, L., Romão, P., Cortes, S., Rolão, N.,
362 Gomes-Pereira, S., Rica-Capela, M.J., Abranches, P. 2001. Cell mediated immunity
363 and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine
364 leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 273–284.

365 Lima, V.M.F., Gonçalves, M.E., Ikeda, F.A., Luvizotto, M.C.R., Feitosa, M.M. 2003.
366 Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral
367 leishmaniasis. *Braz. J. Med. Bio. Res.* 36, 485-489.

368 Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S. 1988. Studies on canine
369 leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine
370 leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82,
371 566–567.

372 Marzochi, M. C. A., Coutinho, S. G., Sabroza, P. C., Souza, M. A., Souza, P. P.,
373 Toledo, L. M., Filho, F. B. R. 1985. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro
374 – Brazil. Caderno de Saúde Pública. 1(4): 432-446.

375 Ministério da Saúde. 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde - Brasil. Manual de
376 vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, 120p.

377 Molina, R.; Amela, C.; Nieto, J.; San-Andreas, M.; Gonzalez, F.; Castillo, J.A.;
378 Lucientes, J.; Alvar, J. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania*
379 *infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg..
380 88: 491-493.

381 Moreno, J., Alvar, J. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the
382 experimental model. Trends Parasitol. Vol.18. nº9. 399-405.

383 Nieto, C.G., García-Alonso, M., Requena, J.M., Mirón, C., Soto, M., Alonso, C.,
384 Navarrete, I. 1999. Analysis of the humoral immune response against total and
385 recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression
386 in canine experimental leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 67, 117– 130.

387 Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., Del-Real, G.,
388 Ruitenber, J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally
389 and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect. Immun. 62, 229–235.

390 Quinnell, R.J., Courtenay, O., Garcez, P.M., Kaye, P.M., Shaw, M.A., Dye, C., Day,
391 M.J. 2003. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral
392 leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 91, 161–168.

393 Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A.M., Marques, M.J., Giunchetti, R.C.,
394 Mayrink, W., Guerra, L.L., Andrade, R.A., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A.
395 2006. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue

396 parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania)*
397 *chagasi*. Vet. Immunol. Immunopathol. 112 (3-4), 102-116.

398 Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J.E., Fisa,
399 R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M., Portús, M. 2001. *Leishmania*
400 *infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs
401 from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. Vet.
402 Parasitol. 96, 265–276.

VER PÁGINA 51

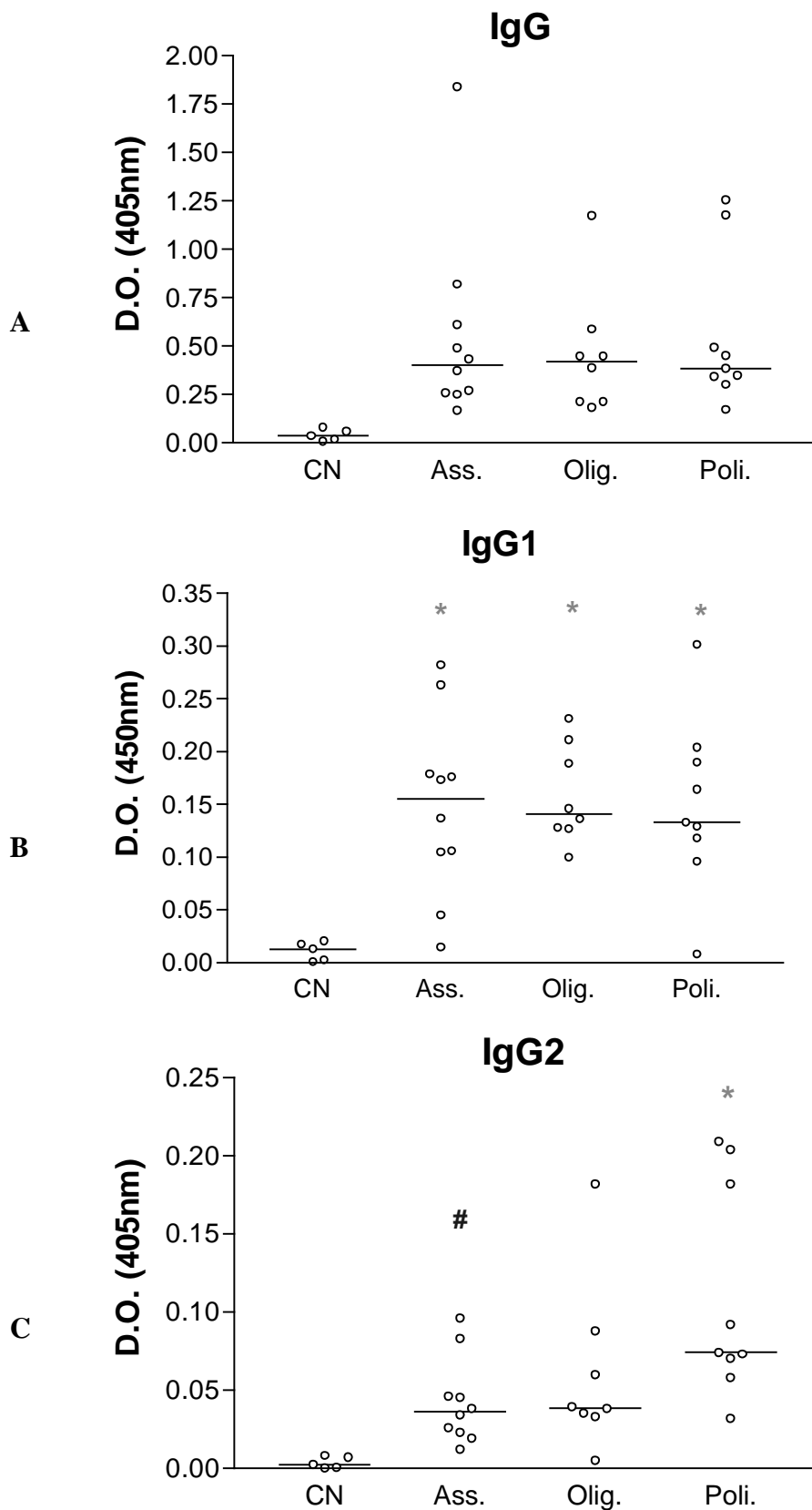


Figura 1. Distribuição dos valores de densidade ótica por fase clínica para IgG, IgG1 e IgG2. — mediana. (*) $P < 0,005$ em relação ao CN, (#) $P < 0,005$ em relação ao Poli. (CN – Controle Negativo; Ass. – Assintomático; Olig. – Oligossintomático; Poli. – Polissintomático).

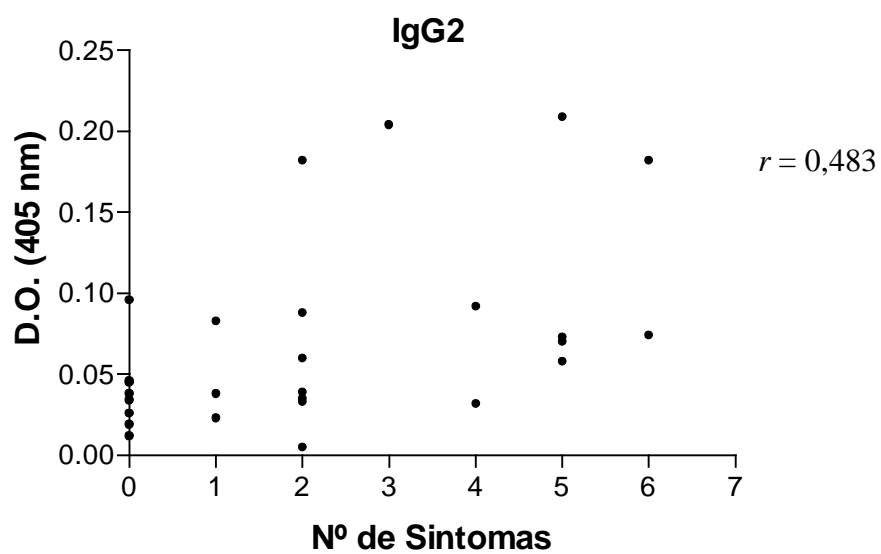
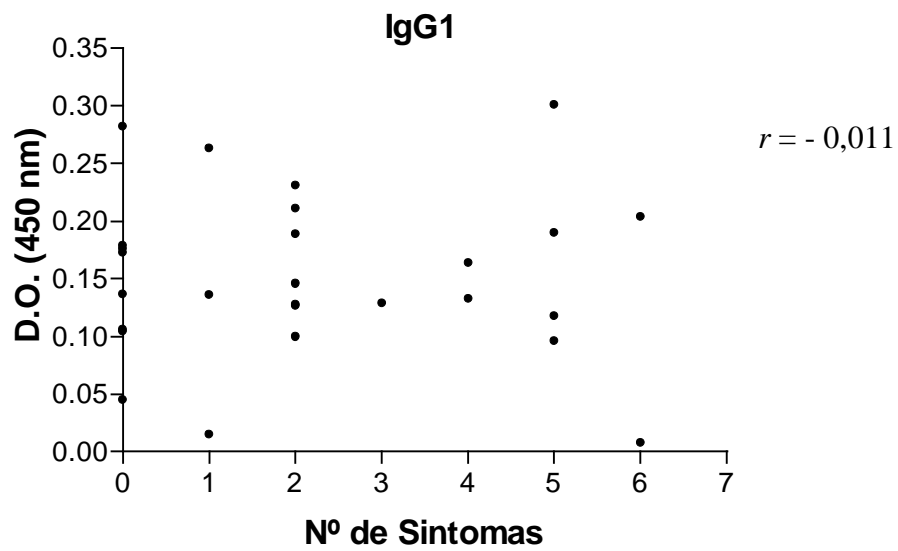
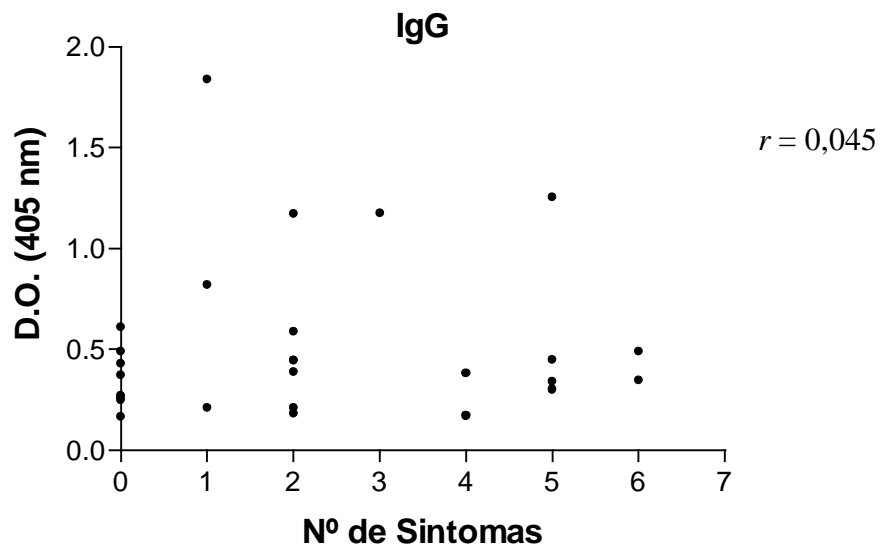


Figura 2. Diagramas de dispersão correspondentes ao número de sinais clínicos encontrados por cão e o valor da densidade ótica obtido para IgG e suas subclasses.

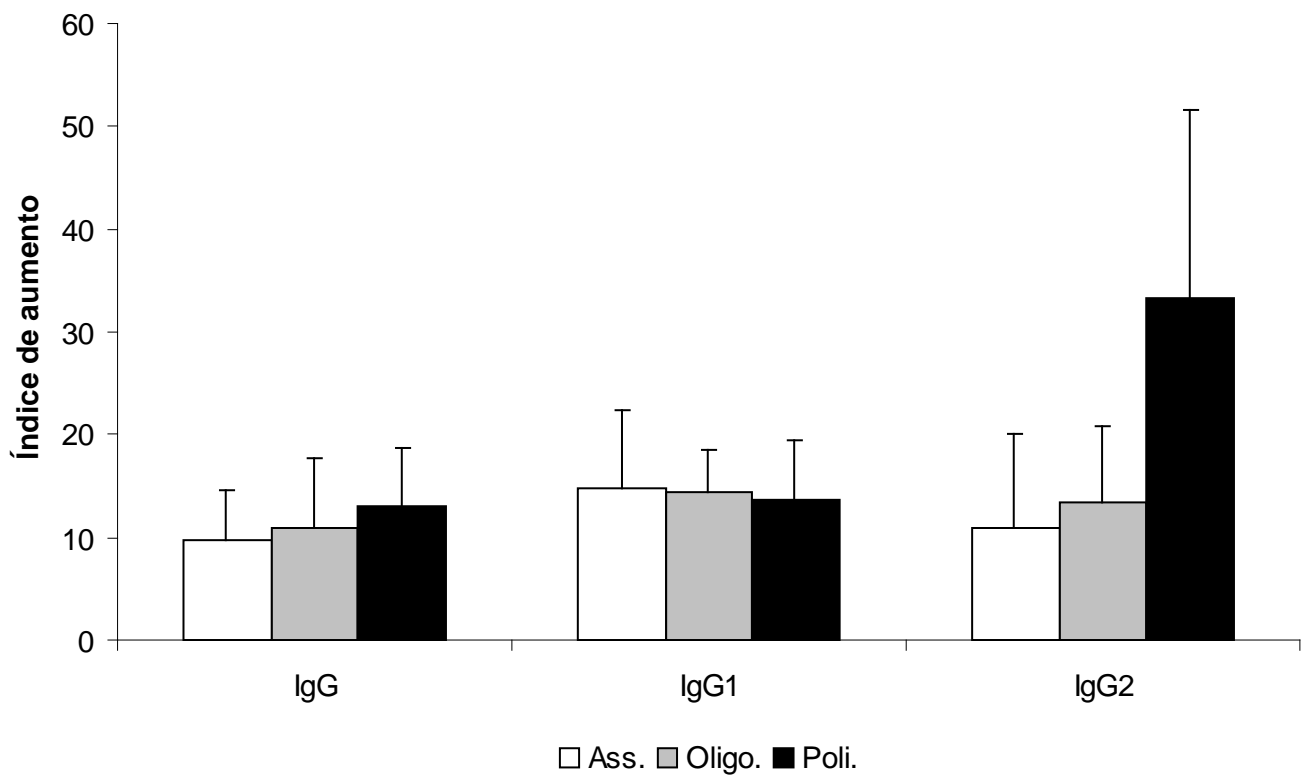


Figura 3. Produção média de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 nos cães de acordo com a sintomatologia clínica. (Ass. – Assintomático; Oligo. – Oligossintomático; Poli. – Polissintomático).

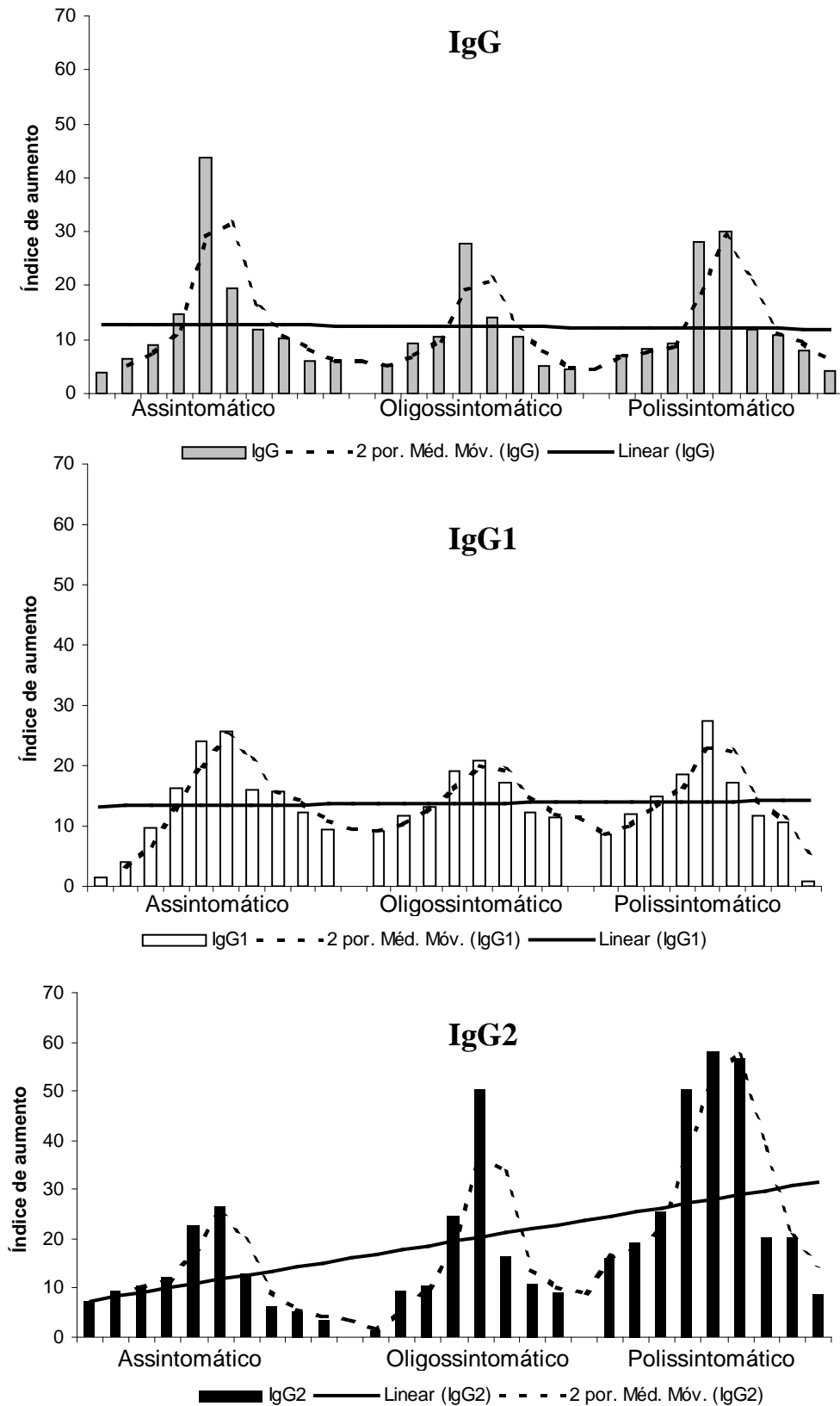


Figura 4. análise individual do índice de aumento da produção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

A soroprevalência encontrada para leishmaniose canina na localidade Vila Nova e o número de animais sintomáticos detectados sendo maior que o de assintomáticos mostra que na região a infecção por leishmaniose pode ser antiga. As subclasses de IgG não tem se saído muito bem como marcadores da infecção por leishmaniose pois os relatos de muitos autores mostram resultados contrastantes inclusive com os resultados encontrados neste trabalho.

A relação homem-meio ambiente em áreas de ocupação no Brasil é um fator preocupante, uma vez que geralmente são áreas onde a ocupação do meio foi feita com o desmatamento indiscriminado, possuem pouca ou nenhuma infra-estrutura, animais geralmente vivem soltos e são criados perto do domicílio, e o aporte de novos moradores vindos das mais diversas regiões é constante, com isso cria-se o cenário para o desenvolvimento tanto da leishmaniose como das mais diversas doenças.

Com isso podemos tirar as seguintes conclusões.

- A localidade Vila Nova do Município de Raposa – MA, possui uma soroprevalência canina relativamente alta para leishmaniose o que a torna uma área de risco e caso medidas de controle da infecção canina não sejam tomadas a infecção poderá se disseminar também para humanos.
- O número de sintomáticos é maior que o de assintomáticos 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 maior número de sinais clínicos apresentados pelos cães, mas este resultado deve ser visto com cautela.

REFERÊNCIAS

- Abranches, P., Campino, L., Santos-Gomes, G.M. 1998. Leishmaniose canina: novos conceitos de epidemiologia e imunologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. *Acta Med Portuguesa*. 11:871-875.
- 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. 2001. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luís – MA, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34 (5):445-451.
- Garcia, A.M. 2004. Estudo da infecção e doença no cão (*Canis familiaris*) *Leishmania (Leishmania) chagasi* em uma área endêmica na ilha de São Luís-Maranhão, Brasil. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão – Mestrado em Saúde e Ambiente. São Luís, MA. 101p
- Lima, V.M.F., Gonçalves, M.E., Ikeda, F.A., Luvizotto, M.C.R., Feitosa, M.M. 2003. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Bio. Res.* 36, 485-489.
- Ministério da Saúde. 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde - Brasil. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, 120p.
- Moreno, J., Alvar, J. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* Vol.18. n°9. 399-405.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., Del-Real, G., Ruitenber, J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229–235.
- World Health Organization. WHO. 2002. Visceral leishmaniasis – Disease information. Available from URL: <http://www.who.int/diseases/leish/diseaseinfo.htm>.

Tabela 1 – Presença de sinais clínicos e títulos de anticorpos específicos de acordo com a sintomatologia dos cães com LVC.

Cão	Alterações cutâneas	Onicogrifose	Linfoadenopatia	Ceratoconjuntivite	Uveíte	Perda de Peso	IgG		IgG1		IgG2	
							D.O.	D.O.	D.O.	D.O.	D.O.	D.O.
1	-	-	-	-	-	-	0,260	0,106	0,106	0,019	0,019	0,019
2	-	-	-	-	-	-	0,168	0,105	0,105	0,012	0,012	0,012
3	-	-	-	-	-	-	0,432	0,045	0,045	0,026	0,026	0,026
4	-	+	-	-	-	-	0,821	0,015	0,015	0,083	0,083	0,083
5	-	-	-	-	-	-	0,491	0,179	0,179	0,045	0,045	0,045
6	-	+	-	-	-	-	1,839	0,263	0,263	0,023	0,023	0,023
7	-	-	-	-	-	-	0,251	0,137	0,137	0,096	0,096	0,096
8	-	-	-	-	-	-	0,611	0,176	0,176	0,046	0,046	0,046
9	-	-	-	-	-	-	0,271	0,282	0,282	0,034	0,034	0,034
10	-	-	-	-	-	-	0,374	0,173	0,173	0,038	0,038	0,038
11	*U	-	-	-	-	-	0,213	0,136	0,136	0,038	0,038	0,038
12	-	+	-	-	+	-	0,390	0,231	0,231	0,035	0,035	0,035
13	-	+	+	-	-	-	0,589	0,146	0,146	0,088	0,088	0,088
14	U	-	+	-	-	-	0,448	0,100	0,100	0,033	0,033	0,033
15	-	+	+	-	-	-	0,183	0,211	0,211	0,005	0,005	0,005
16	-	+	+	-	-	-	1,174	0,189	0,189	0,182	0,182	0,182
17	-	-	+	-	-	+	0,213	0,128	0,128	0,060	0,060	0,060
18	A	-	+	-	-	-	0,447	0,127	0,127	0,039	0,039	0,039
19	H,U	+	-	-	-	-	1,178	0,129	0,129	0,204	0,204	0,204
20	A,U	+	+	-	-	-	0,384	0,133	0,133	0,092	0,092	0,092
21	-	+	+	+	-	+	0,172	0,164	0,164	0,032	0,032	0,032
22	A,H	+	+	-	-	+	0,302	0,096	0,096	0,058	0,058	0,058
23	A,U	+	+	-	-	+	1,256	0,190	0,190	0,209	0,209	0,209
24	H,U	+	+	-	-	+	0,342	0,301	0,301	0,070	0,070	0,070
25	A,H,U	+	-	-	-	+	0,451	0,118	0,118	0,073	0,073	0,073
26	A,E,H,U	+	-	-	-	+	0,350	0,204	0,204	0,182	0,182	0,182
27	A,U	+	+	+	-	+	0,492	0,008	0,008	0,074	0,074	0,074

* U – Úlcera, A-Alopecia, H – Hiperqueratose, E – Eczema,

