

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

CRISTIANE COSTA DE CARVALHO

Determinação da carga parasitária por PCR semiquantitativa em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e sua associação com sinais clínicos da doença.

SÃO LUÍS

2007

CRISTIANE COSTA DE CARVALHO

Determinação da carga parasitária por PCR semiquantitativa em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e sua associação com sinais clínicos da doença.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre.

ORIENTADORES:

Prof^a Dr^a. SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA

Prof. Dr. JOSÉ MANUEL MACÁRIO REBÊLO

SÃO LUÍS

2007

Carvalho, Cristiane Costa de.

Determinação da carga parasitária por PCR semiquantitativa em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e sua associação com sinais clínicos da doença.
/ Cristiane Costa de Carvalho. - São Luís, 2007.

70f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientadora: Silma Regina Ferreira Pereira.

Co-orientador: José Manuel Macário Rebêlo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente, 2007.

1. Leishmaniose visceral. I. Pereira, Silma Regina Ferreira. II. Rebêlo, José Manuel Macário. III. Título.

CDU 616.993.161

CRISTIANE COSTA DE CARVALHO

Determinação da carga parasitária por PCR semiquantitativa em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* e sua associação com sinais clínicos da doença.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em ____ de _____ de 2007, considera a candidata _____.

Prof^a Dr^a. Silma Regina Ferreira Pereira
Presidente

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
1^o Examinador

Prof^a Dr^a. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
2^o Examinador

Prof. Dr. Oliver Dieter Willi Kuppinger
3^o Examinador

Suplente

Dedico

*À minha mãe, que lá do céu, me acompanha
em cada etapa cumprida.*

Meu eterno carinho

Aos cães Loli, Mirla, Preta, Lesse, Nina, Marisol, Branquinha, Cabeludo, Jek, Shiboca, Voadeira, Lesse, Pitôco, Keit, Leão, Lesse, Emi, Tomás, Keth, Duque, Chupila, Tupã, (sem nome), Betoven, Snoopy, Chorrin, Black e a todos os outros 206 cães amostrados, sem os quais seria impossível este estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo auxílio financeiro (Proc. nº 620081/2004-0 ACT) e à FAPEMA pela bolsa de mestrado.

Aos meus orientadores, Dr. José Manuel Macário Rebêlo e Dr^a Silma Regina Ferreira Pereira, pela confiança, paciência e discussão deste trabalho.

À Prof^{ta} Dr^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, pelas inestimáveis colaborações e apoio incondicional nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Oliver Dieter Willi Kuppinger, pelas valiosas colaborações e revisão do abstract.

À Dr^a Aldina Barral, Coordenadora do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pelo acolhimento e apoio em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Luíz Ricardo Goulart Filho, Coordenador do Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, e à Dra. Adriana Neves, pela orientação e colaboração técnica.

À Santana Pereira Viegas, técnica do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Maranhão, por sua valiosa colaboração e apoio.

À Regiane Soares, amiga e companheira de tantas “PCRs”; e à Lucilene Amorim, também amiga e companheira de pesquisa.

Aos companheiros dos Laboratórios de Genética e Biologia Molecular e de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão, em especial: Suelen, Fernanda, Ianik, Rosa Maria, Mayara, Nayara, Sanara e Rafael.

A todos os colegas do Mestrado em Saúde e Ambiente da UFMA.

A João Freitas, pelo seu apoio, carinho e compreensão.

À minha família, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência para dedicação a esta pesquisa.

E por fim,

A Deus, minha fortaleza, meu refúgio, sem o qual não teria chegado onde estou.

“Da minha aldeia vejo tudo o que se há no universo. Por isso a minha aldeia é tão grande como outra terra qualquer. Porque sou do tamanho do que vejo e não do tamanho da minha altura”.

Fernando Pessoa

RESUMO

O município de Raposa (Maranhão, Brasil) é uma área endêmica de leishmaniose visceral humana e canina. Neste município, cães são considerados o principal reservatório de *Leishmania chagasi*. O objetivo deste estudo foi investigar a concentração do DNA parasitário em diferentes tecidos de cães infectados e sua associação com sinais clínicos de leishmaniose. Iniciamos este estudo com a coleta de sangue de 233 cães para diagnóstico sorológico da infecção. Dentre todos os cães examinados, 69 apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* no teste ELISA. Destes, apenas 27 puderam ser recapturados e estudados. Os animais foram classificados de acordo com avaliação clínica em assintomáticos (n=10); oligossintomáticos (n=8) e polissintomáticos (n=9). A técnica de PCR quantitativa foi desenvolvida e padronizada para avaliar a concentração de DNA parasitário em sangue, medula, linfonodo, baço e pele. O parasito foi detectado em todas as amostras de linfonodo analisadas (100%). O tecido com os maiores níveis de DNA parasitário foi o linfonodo, seguido pelo baço, sangue, medula e pele. Comparando-se os tecidos analisados, o linfonodo foi o tecido com as maiores cargas parasitárias, sem exceção, entre animais assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos. Contrariamente a outros estudos, detectamos baixos níveis de DNA parasitário em amostras de pele. A PCR quantitativa padronizada neste estudo foi um método sensível, rápido e econômico para detectar e determinar os níveis de DNA parasitário de *Leishmania chagasi*. Em cães, o linfonodo é o tecido mais acometido pelo parasito e com maiores níveis de DNA, podendo ser considerado o sítio ideal para o monitoramento da leishmaniose canina.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*, leishmaniose visceral canina, carga parasitária.

ABSTRACT

The municipal district of Raposa located in the State of Maranhão, Brazil is an endemic area of human and canine visceral leishmaniasis. Dogs are considered to be the principal *Leishmania chagasi* reservoir in this location. The objective of this study was to examine the relative levels of parasitic DNA in different tissues of infected dogs and their association with clinical signs of Leishmaniasis. We initiated this study by collecting blood samples from 233 distinct dogs that were analyzed by means of serological diagnosis. Of all examined dogs, 69 were positive in the anti-*Leishmania* ELISA. According to technical reasons only 27 of the *Leishmania* infected dogs could be recaptured and studied. The animals were classified according to their clinical signs in asymptomatics (10 animals), oligosymptomatics (8 animals) and polysymptomatics (9 animals) groups. A quantitative PCR method was developed and established in order to examine the parasitic load in blood, bone marrow, lymph node, spleen and skin. The parasite could be detected in lymph nodes of all animals analyzed (100%). The tissue with the highest parasitic load was lymph nodes followed by spleen, blood, bone marrow and skin. Comparing all analyzed tissues, the lymph nodes presented the highest levels of parasitic DNA, without exception, regardless their symptoms' classification. Contrary to various other studies, we have detected the lowest parasitic DNA concentration in skin tissues. The quantitative PCR assay established in this study was sensitive, fast and inexpensive for qualitative and quantitative analyses of the *Leishmania chagasi* DNA. The canine lymph node is the most frequently infected tissue, with greater levels of parasitic DNA, and may be considered a target tissue for leishmaniasis monitoring in dogs.

Key-words: *Leishmania chagasi*, canine visceral leishmaniasis, parasitic load.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Área de estudo: Mapa da localização geográfica do município de Raposa e imagem aérea do município de Raposa-MA. 33
- FIGURA 2** Gel de agarose a 1,5% mostrando produto de kDNA de *L. chagasi* com 145 pb. 39
- FIGURA 3** Percentual de positividade para DNA de *Leishmania* em cinco diferentes tecidos analisados em cães com diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral. 42
- FIGURA 4** Produtos de amplificação (145pb) obtidos com diferentes diluições do parasita (*L. chagasi*). 45
- FIGURA 5** Curva-padrão (regressão linear) obtida a partir da leitura das densidades ópticas dos produtos amplificados das diluições seriais de kDNA da cepa de *L. chagasi*. 46
- FIGURA 6** Carga parasitária em cada tecido de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* de acordo com a fase clínica da doença. 48
- FIGURA 7** Carga parasitária em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* de acordo com número de sinais clínicos apresentado pelos animais. 49

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Número de amostras positivas para DNA de *Leishmania chagasi* em cada tecido de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose canina de acordo com a fase clínica da doença. 43
- TABELA 2** Número absoluto de cães com resultado positivo para amplificação de DNA de *Leishmania chagasi* nos cinco tecidos de acordo com a fase clínica da doença. 44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Leishmaniose	17
2.2	Ciclo biológico	19
2.3	Agente etiológico	21
2.4	Reservatórios	24
2.5	Epidemiologia	26
2.6	Diagnóstico	27
3	A QUESTÃO	29
4	OBJETIVOS	30
4.1	Objetivo Geral	30
4.2	Objetivo Específico	31
5	MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1	Área	31
5.2	Desenho do estudo	32
5.2.1	Caracterização dos cães da área	34
5.3	Avaliação clínica	34
5.4	Amostras de tecidos	35
5.4.1	Extração de DNA das amostras de tecidos	35
5.5	Extração de DNA da cepa de <i>L. chagasi</i>	37
5.6	Testes de sensibilidade e de inibição	37
5.7	Reação em Cadeia da Polimerase	38
5.8	Cálculo da carga parasitária em amostras de tecidos	39
5.9	Análise estatística	40
6	RESULTADOS	41
6.1	Avaliação clínica e diagnóstico molecular	41
6.2	Carga parasitária	45
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, esplenomegalia tropical, febre dundun, é um crescente problema de saúde pública no Brasil e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

No Brasil, é causada por um protozoário da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, espécie *Leishmania (L.) chagasi* Cunha & Chagas, 1937. Seu ciclo evolutivo é caracterizado por apresentar duas formas, uma amastigota que é obrigatoriamente parasita intracelular em vertebrados, e outra promastigota, que se desenvolve no tubo digestivo dos vetores invertebrados e em meios de culturas artificiais (LEÃO, 1997).

Leishmania chagasi é encontrada nas Américas, desde os Estados Unidos até o norte da Argentina, ocorrendo casos humanos da doença desde o México até a Argentina. No Brasil, é uma doença endêmica, mas ocorrem surtos com alguma frequência. Sua transmissão, inicialmente silvestre ou concentrada em pequenas localidades rurais, tem sido relatada também em centros urbanos de médio porte, em área domiciliar ou peri-domiciliar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

A leishmaniose visceral pode ser considerada uma zoonose de canídeos, tendo como vetor o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912. Dependendo das características ecológicas da área e do tipo de hospedeiro canídeo - silvestre (raposa) ou doméstico (cão) - a doença pode ser classificada, epidemiologicamente, como leishmaniose visceral silvestre ou leishmaniose visceral doméstica ou peridoméstica, respectivamente. Este tipo epidemiológico ocorre na

região Nordeste do Brasil, sendo o cão infectado a principal fonte de infecção para o flebotomíneo vetor da doença. (DEANE & DEANE, 1954).

Os cães infectados podem ou não desenvolver quadro clínico da doença (sintomáticos e assintomáticos, respectivamente) após um período de tempo extremamente variável, de uns poucos meses a vários anos depois da inoculação do parasito (LANOTTE *et al.*, 1979). Sinais clínicos (emagrecimento; eriçamento e queda de pêlos; nódulos ou ulcerações - mais freqüentes nos bordos das orelhas; hemorragias intestinais; paralisia de membros posteriores; ceratite com cegueira e caquexia) aparecem progressivamente e apresentam-se como sinais de doença visceral e cutânea (LACHAUD *et al.*, 2002b).

O fato de o cão ser considerado o mais importante reservatório urbano de *L. chagasi* faz da leishmaniose visceral não somente um tema científico de grande interesse investigativo, mas também um problema de saúde pública ainda não resolvido (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004), pois, no homem, a leishmaniose visceral também se apresenta como uma doença oportunista em pacientes imunocomprometidos e HIV-positivos, especialmente em áreas onde a leishmaniose é endêmica (REALE *et al.*, 1999).

O principal substrato patológico da leishmaniose visceral é a multiplicação de amastigotas em células fagocitárias mononucleares de órgãos internos, tais como, baço, fígado e medula óssea. Em cães, parasitas também são encontrados em linfonodos periféricos e pele (OLIVEIRA *et al.*, 1993). O parasito pode ser isolado de qualquer órgão infectado ou de lesões. Diferentes testes, tais como, IFAT (“Indirect Immunofluorescence Antibody Test”), ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbant Assay”), microscopia direta de tecidos e cultura *in vitro* são os

mais utilizados para o diagnóstico. Contudo, ensaios de reação imune dependem das condições gerais de saúde do animal. Desse modo, técnicas microbiológicas, microscopia direta e culturas permanecem como padrão de diagnóstico definitivo. Entretanto, estas técnicas tomam muito tempo e podem falhar quando a carga parasitária na amostra é baixa (REALE *et al.*, 1999).

Recentemente, significativo progresso no desenvolvimento de novas técnicas para o diagnóstico da leishmaniose visceral tem sido realizado. A PCR (“Polymerase Chain Reaction”), por exemplo, tem sido aplicada como um método para investigar a presença do parasito, assim como para quantificar a carga parasitária em pacientes infectados. Diversos estudos demonstraram a eficácia da técnica de amplificação de DNA de *Leishmania* e sua sensibilidade na detecção deste parasito. SOLANO-GALLEGO *et al.* (2001) ao utilizarem dois métodos (PCR e ELISA) para determinar a prevalência da infecção em cães, obtiveram 63 cães positivos através do método molecular, enquanto apenas 26 foram diagnosticados por sorologia.

Além da alta especificidade e sensibilidade, o diagnóstico por PCR é rápido e seguro. A análise molecular tem permitido mais esclarecimentos sobre aspectos epidemiológicos da doença, principalmente em áreas endêmicas; e vem se configurando em uma nova perspectiva nas investigações sobre os aspectos evolutivos da infecção em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE

As Leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários pertencentes ao reino Protista, especificamente ao filo Masthigophora, que inclui todos os protozoários que possuem um ou mais flagelos. As formas da doença estão relacionadas à espécie do parasito e diferem em distribuição geográfica, hospedeiros, vetores envolvidos, taxas de incidência e de mortalidade (LAINSON & SHAW, 1987; ASHFORD *et al.*, 1992).

A Leishmaniose visceral foi descrita na Grécia em 1835 quando então era denominada “ponos” ou “hapoplinakon”. Foi na Índia, em 1869, que recebeu as denominações “kala-jwar” que significa febre negra e “kala-azar” (kala = negra; azar = pele) em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele durante a evolução da doença (MARZOCHI *et al.*, 1981). Embora o termo calazar seja utilizado indiscriminadamente e considerado como sinônimo de leishmaniose visceral, somente o tipo indiano provoca o escurecimento da pele.

O primeiro caso no Brasil foi descrito por MIGONE, em 1913. O paciente era um imigrante italiano que vivera muitos anos em Santos - São Paulo, e após viajar para Mato Grosso adoeceu, tendo sido diagnosticada a doença no Paraguai (ALENCAR, 1977). Foi PENNA, em 1934, um patologista do Instituto Oswaldo Cruz, quem iniciou os estudos sobre a distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral nas Américas, quando comprovou, parasitologicamente, 41 casos dentre as 40.000 viscerotomias examinadas para febre amarela provenientes de vários estados do Brasil.

Apesar de Evandro Chagas, em 1936, ter diagnosticado o primeiro caso de leishmaniose visceral em vida no Brasil, acredita-se que em 1934 o Estado do Maranhão observara o seu primeiro caso da doença, sendo o diagnóstico feito por Madureira-Pará. A migração de outros nordestinos para o Maranhão acabaria contribuindo para torná-lo um novo foco da doença. Em 1967, foram diagnosticados e notificados cinquenta e três casos por viscerotomias e dois casos autóctones no município de São José de Ribamar, localizado na Ilha de São Luís. Em 1974, Brandão descreveu um novo caso autóctone da doença. Deste período até 1981, não houve relato de ocorrência de leishmaniose visceral no Estado, até que em 1982, Silva e colaboradores diagnosticaram a doença em quatro crianças de uma mesma família residentes na periferia da capital do Estado, sendo também descritos, no mesmo ano, trinta e nove casos autóctones, caracterizando o surto epidêmico com expansão da doença para outras áreas da ilha de São Luís (COSTA *et al.*, 1995).

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença crônica e debilitante. A doença apresenta um caráter consuntivo que leva a um quadro de emagrecimento progressivo, edema, alterações na queda dos cabelos, além de episódios febris associados a hepatoesplenomegalia grave, anemia, podendo ocorrer manifestações intestinais e fenômenos hemorrágicos (MARZOCHI *et al.*, 1981). A relação entre o estabelecimento da doença e o estado de desnutrição dos infectados é conhecida (HARISSON *et al.*, 1986; PEARSON *et al.*, 1992), bem como com o estado de imunossupressão decorrente da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e de outras patologias (BADARÓ *et al.*, 1986; ALTES *et al.*, 1991; GRADONI *et al.*, 1993).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico da leishmaniose visceral é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Este parasita apresenta ciclo de vida heteroxênico, com dois estágios distintos: um flagelar móvel, promastigota, que vive extracelularmente no aparelho digestivo de flebotomíneos; e um estágio amastigota imóvel, que reside dentro de macrófagos de vertebrados (GRIMALDI & TESH, 1993).

A ordem Kinetoplastida é caracterizada pela presença de uma mitocôndria incomum, denominada cinetoplasto, rica em DNA que se encontra na forma de milhares de círculos entrelaçados, formando o DNA cinetoplasto (kDNA). No gênero *Leishmania* estes círculos compreendem dois componentes: os minicírculos e os maxicírculos. Estes últimos se encontram em pouca quantidade, são pouco heterogêneos, variam de tamanho (20 a 40kb), são em número de 30 a 50 cópias e neles estão presentes genes que codificam RNA ribossomal. Por outro lado, os minicírculos são encontrados em grande quantidade, cerca de 10.000 cópias por célula, são mais heterogêneos, têm aproximadamente de 1 a 2kb de tamanho e sua função genética parece estar relacionada à codificação de RNAs guias, que controlam a especificidade de edição do RNA. (BARKER *et al.*, 1986; BOZZA *et al.*, 1995; BREWSTER *et al.*, 1998).

Os minicírculos contêm uma região conservada de no mínimo 120pb, que pode ser evidenciada em diferentes espécies de *Leishmania*, enquanto as regiões restantes variam entre as espécies. Sabe-se atualmente que, no kDNA de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* (sinonímia *L. infantum*), as seqüências dos minicírculos apresentam uma região variável de cerca de 600pb e uma região constante de aproximadamente 200pb

conservada entre as espécies do Velho e Novo Mundo (BARKER *et al.*, 1986; BOZZA *et al.*, 1995; BREWSTER *et al.*, 1998).

No gênero *Leishmania* encontram-se aproximadamente 30 espécies, das quais cerca de 20 causam doenças em humanos (ASHFORD, 2000). Segundo LAINSON & SHAW (1987), as espécies de *Leishmania* nas Américas pertencem a dois subgêneros, de acordo com seu desenvolvimento no vetor: *Viannia* (aderem-se pelo flagelo às paredes do piloro e íleo) e *Leishmania* (apresentam desenvolvimento limitado ao estômago do vetor), os quais se subdividem em várias espécies, sendo *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 a espécie relacionada à leishmaniose visceral no Brasil.

De maneira geral, o protozoário *Leishmania* possui um único cinetoplasto, o qual é utilizado para diferenciar morfologicamente as espécies entre si através das variações no seu tamanho, diâmetro e posição. As espécies podem ainda ser distinguidas por características sorológicas, bioquímicas e moleculares. (GRIMALDI & TESH, 1993; FERNANDES *et al.*, 1994). Taxonomicamente, a posição sistemática da espécie *Leishmania chagasi* proposta por LEVINE *et al.* (1980) é: Reino Protista (Haeckel, 1886); Subreino Protozoa (Goldfuss, 1817); Filo Sarcomastigophora (Honiberg & Balamuth, 1963); Subfilo Mastigophora (Diesing, 1866); Classe Zoomastigophora (Calkins, 1909); Ordem Kinetoplastida (VickKerman, 1976); Subordem Trypanosomatina (Kent, 1880); Família Trypanosomatidae (Grobben, 1905); Gênero *Leishmania* (Ross, 1903); Subgênero *Leishmania* (Saf'Janova, 1982); Espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937).

2.3 CICLO BIOLÓGICO

No ciclo biológico da leishmaniose, o parasito circula entre hospedeiros animais na natureza, sendo transmitido através da picada do flebotomíneo infectado. Somente fêmeas adultas agem como vetores por serem hematófagas e antropofílicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Após um período de quatro a sete dias após o repasto infectante de formas amastigotas de *Leishmania* pelo vetor, estas se transformam em promastigotas e migram para as partes anteriores do tubo digestivo do inseto, atingindo a probóscide (aparelho picador-sugador). Ao picar um vertebrado, há inoculação das formas promastigotas juntamente com a saliva do vetor, as quais são fagocitadas por macrófagos. Posteriormente, promastigotas internalizam o flagelo e são transformadas em amastigotas nos vacúolos intracitoplasmáticos onde se replicam por divisão binária. Os macrófagos, repletos de formas amastigotas, ficam desvitalizados e rompem-se liberando essas formas, que serão, num processo contínuo, fagocitadas por novos macrófagos (ASHFORD, 2000).

Após a fagocitose, os macrófagos são drenados via linfática para linfonodos regionais com conseqüente disseminação para outros órgãos. O sistema hemolinfático é o inicialmente acometido, porém como dois tipos de resposta imune estão envolvidos, as lesões mais exuberantes estarão presentes em animais suscetíveis, enquanto naqueles chamados resistentes, as alterações patológicas podem ser discretas macroscopicamente ou até mesmo imperceptíveis. (CARDOSO & CABRAL, 1998).

Foi proposto que a resistência à doença estaria associada à ativação da resposta Th1 mediada por células CD4+ e produção de interferon gama, fator de

necrose tumoral e interleucinas (IL) IL-2 e IL-12. A suscetibilidade, por sua vez, estaria relacionada à doença progressiva e envolveria a ativação da resposta Th2 com a expansão e proliferação de células B e produção de IL-4, IL-5 e IL-10. Essa resposta humoral é responsável pelo aumento dos níveis séricos de imunoglobulinas, contribuindo para a formação de imunocomplexos, os quais não conferem efeito protetor (KEMP *et al.*, 1996; KHARAZMI *et al.*, 1996; NABORS & FARRELL, 1996).

Embora nas infecções causadas por agentes intracelulares uma resposta imune desviada para o pólo Th2 seja maléfica, porque aumenta a suscetibilidade às infecções e permite a multiplicação e disseminação do parasito, o conceito de que uma resposta Th1 seja protetora deve ser visto com reserva, pois uma atuação equilibrada do sistema imunológico é muito importante para a contenção do parasita sem destruição tecidual, fazendo com que, embora possa continuar presente, o agente infectante não cause doença (MACHADO *et al.*, 2004). Fatores imunogenéticos que determinam a suscetibilidade ou resistência dos animais à infecção ainda não estão totalmente elucidados, de modo que a progressão da doença apresenta uma heterogeneidade de respostas.

Trabalhos recentes sobre resposta imune (celular e humoral) e manifestação clínica da doença em cães naturalmente infectados em uma área endêmica no Estado do Maranhão indicam que a progressão da doença está associada a altos níveis de óxido nítrico e de interferon gama, e a baixos níveis de fator de necrose tumoral alfa, os quais podem estar relacionados ao mecanismo que envolve a imunossupressão nos animais e diminuição da resposta inflamatória associada ao fator de necrose tumoral, contribuindo para a proliferação do parasito (SILVA, 2006) e

ALMEIDA (2006) sugere que os níveis séricos de anticorpos IgG2 podem ser relacionados à progressão clínica da doença em cães.

No homem, a manifestação clínica da leishmaniose resulta de um desequilíbrio na relação parasita-hospedeiro, estando intimamente relacionada aos mecanismos de resposta imune deste último. Por outro lado, nos reservatórios silvestres, parece haver uma relativa “adaptação imunológica”, traduzindo-se geralmente em doença autolimitada ou inaparente. Muitas formas de leishmaniose são consideradas zoonóticas, nas quais animais silvestres e domésticos são reconhecidos como reservatórios, sendo o homem considerado um hospedeiro secundário e acidental (DESJEUX, 1996).

A ocorrência das espécies de *Leishmania* é normalmente limitada à distribuição do vetor que, por sua vez, é limitada geograficamente. Nas Américas, o protozoário pode ser transmitido pela picada de fêmeas de várias espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do gênero *Lutzomyia* (ASHFORD, 2000). No Brasil, o vetor responsável pela transmissão de *L. chagasi* é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912.

Entre os flebotomos encontrados na ilha de São Luís (Maranhão) destacam-se *Lu. longipalpis*, *Lu. whitmani*, *Lu. wellcomei*, *Lu. flaviscutellata* e *Lu. umbratilis*. *Lutzomyia longipalpis* é a mais freqüente das espécies encontradas no ambiente domiciliar e talvez a melhor adaptada ao convívio com o homem e animais domésticos. Esta espécie se encontra distribuída em quase toda a Ilha, inclusive nas zonas periféricas dos aglomerados urbanos e fazendo com que a leishmaniose visceral assumira um caráter urbano (REBÊLO *et al.*, 1999).

2.4 RESERVATÓRIOS

Algumas espécies de mamíferos silvestres (marsupiais, canídeos silvestres) e domésticos (canídeos domésticos) podem ser fontes de infecção e de manutenção da doença em áreas endêmicas.

Marsupiais são encontrados infectados por várias espécies de protozoários flagelados, sendo que os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são os mais relevantes em Saúde Pública (SHERLOCK *et al.*, 1984; TRAVI *et al.*, 1994). A espécie *Didelphis marsupialis* (Marsupialia, Didelphidae) costuma ser encontrada em florestas alteradas pela ação antrópica, sendo vista com frequência nos quintais das residências situadas nas bordas das matas, visitando galinheiros e em latas de lixo em busca de alimento. Apresenta hábitos crepusculares e noturnos. Esconde-se em ocos de árvores onde passa o dia dormindo. Seu comportamento sinantrópico e o reduzido poder de deslocamento (em torno de 2,5 Km) torna possível o compartilhamento dos vetores e parasitas com o homem e o cão (TRAVI *et al.*, 1994).

Leishmania (L.) chagasi tem a capacidade de infectar e produzir doença em canídeos sejam eles domésticos ou silvestres. DEANE & DEANE (1954) demonstraram essa capacidade ao encontrarem parasitas em cães (*Canis familiaris*) e em raposas da espécie *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae), tanto sadios como doentes.

De acordo com MARZOCHI *et al.* (1985), LAVERAN, em 1917, já distinguia duas formas na evolução do calazar canino: uma forma aguda, levando o animal ao óbito em poucos meses e outra forma latente, com duração aproximada de dois anos, podendo evoluir para a cura. LANOTTE *et al.* (1979) realizando estudos

imunoclínicos em cães de uma área endêmica para *L. infantum*, também observaram que a doença se manifestava de duas formas: a primeira (patente) que se caracterizava por animais com sintomatologia víscero-cutânea e alta taxa de anticorpos. A segunda forma (latente), quando os animais não apresentavam sintomas e a taxa de anticorpos era baixa. Este último tipo de manifestação ainda poderia apresentar dois desfechos distintos: a conversão do perfil assintomático em doença ou a evolução para a cura espontânea.

A forma patente manifesta-se através de uma clínica bastante semelhante à humana, com febre irregular, anemia e emagrecimento progressivo chegando, na fase terminal, a uma caquexia intensa. Os sinais mais evidentes estão relacionados ao emagrecimento e às alterações cutâneas: perda de pêlos (alopecia) focal ou generalizada, pequenas lesões crostosas, descamação ou dermatite que acompanham a alopecia e alongamento das unhas (onigrifose) (MARZOCHI *et al.*, 1985). Segundo HOMMEL (1978, *apud* MARZOCHI *et al.*, 1985), a alopecia é explicada pela ação do parasito no folículo piloso ou devido a um distúrbio do metabolismo do ácido pantotênico, decorrente da lesão hepática, ou ainda, pela deposição dos imunocomplexos existentes na membrana basal da pele, induzindo um processo auto-imune desencadeador da perda de pêlos.

O alongamento das unhas costuma ser explicado pelo estímulo da matriz ungueal pelo parasito. Além disso, o estado de apatia em que o animal permanece durante a doença dificulta o desgaste natural das unhas.

A hepatoesplenomegalia e a adenopatia generalizada são conseqüentes do acometimento do sistema fagocitário mononuclear (SFM). De acordo com ADLER (1964 *apud* MARZOCHI *et al.*, 1985), o emagrecimento é atribuído ao desequilíbrio

protéico, que levaria a uma intensa albuminúria. CATARSINI (1981), no entanto, explica este fenômeno pelo comprometimento da mucosa digestiva do animal.

2.5 EPIDEMIOLOGIA

Casos de leishmaniose visceral têm sido notificados em 19 dos 26 Estados da Federação, e no Distrito Federal, atingindo quatro das cinco regiões brasileiras. De acordo com dados preliminares dos casos confirmados no ano de 2005, a maioria deles tem sido registrada no Nordeste (55,5%), seguido pela região Sudeste (21,5%), região Norte (16%), e, finalmente, a região Centro-Oeste (7%). Todos os estados que compõem a região Nordeste têm casos confirmados desde 1982, sendo que o Maranhão apresenta-se como o Estado com maior número de casos desde o ano de 2002. Outros Estados do nordeste com elevado número de casos são Bahia, Ceará e Piauí (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Leishmania chagasi é encontrada nas Américas desde os Estados Unidos da América até o norte da Argentina, ocorrendo casos humanos da doença desde o México até a Argentina. No Brasil, é uma doença endêmica, mas ocorrem surtos com alguma frequência. Sua transmissão, inicialmente silvestre ou concentrada em pequenas localidades rurais, já ocorre em centros urbanos de médio porte, em área domiciliar ou peridomiciliar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). Os surtos da doença são decorrentes de resposta imune precária por parte dos hospedeiros (GRIMALDI & TESH, 1993) ou de situações eco-epidemiológicas que favoreçam o aumento da quantidade de vetores infectados (TESH, 1995).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO, 2002), a leishmaniose é endêmica em 88 países nos cinco continentes e estima-se que 500 mil pessoas estejam infectadas. Sua distribuição geográfica é limitada pela distribuição do vetor e sua suscetibilidade a climas frios, com melhor adaptação a clima tropical e subtropical (DESJEUX, 1996).

A prevalência da leishmaniose no mundo é baseada em notificação e publicação de casos. No Brasil, apesar de ser considerada doença de notificação compulsória, por vezes é negligenciada e dados oficiais são grosseiramente subestimados.

A transmissão da *Leishmania*, durante as décadas de 30 e 40 no Brasil, estava mais associada à entrada do hospedeiro humano em áreas silvestres, em decorrência do desmatamento para novas frentes de agricultura e construção de estradas. Entretanto, tem havido mudanças no comportamento epidemiológico da leishmaniose visceral. A doença tem sido registrada em periferias de grandes centros, apresentando ciclo de transmissão envolvendo flebotomíneos de hábitos domiciliares e peridomiciliares, assim como reservatórios domésticos, principalmente cães (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leishmaniose visceral é feito através de uma associação entre dados clínicos e epidemiológicos combinados com pelo menos um teste diagnóstico laboratorial. Para o diagnóstico podem ser utilizados testes parasitológicos (microscopia direta); sorológico (ELISA “Enzyme-Linked Immunosorbant Assay” ou

IFAT “Indirect Immunofluorescence Antibody Test”) e testes por biologia molecular (PCR “Polymerase Chain Reaction”) (REALE *et al.*, 1999).

O teste parasitológico por microscopia consiste na observação do material coletado em lâminas e identificação de amastigotas dentro de macrófagos. A sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos dependem do tipo, fonte e pureza do antígeno empregado, reprodutibilidade e complexidade das técnicas. Além disso, os antígenos de *Leishmania* apresentam epítomos que podem apresentar reação cruzada com outros microorganismos, como *Trypanosoma*, *Mycobacterium*, *Plasmodium* e *Schistosoma* (KAR, 1995). Para o diagnóstico molecular, técnicas baseadas em análise de DNA estão sendo cada vez mais utilizadas. A PCR é considerada um método sensível na detecção de *Leishmania*, independente da escassez de parasitas no material amostrado (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004).

Os minicírculos de kDNA, por estarem presentes em múltiplas cópias no cinetoplasto e por suas regiões conservadas e variadas, têm sido utilizados em técnicas moleculares para diagnóstico de infecções causadas por *Leishmania*. Primers desenhados para amplificar tais seqüências fornecem alta sensibilidade e diagnóstico rápido para infecção por este parasita (SMYTH *et al.*, 1992).

Atualmente, tem sido realizada análise quantitativa dos produtos de amplificação de seqüências do DNA do parasito em amostras de pacientes a fim de se determinar o nível de parasitemia (MARY *et al.*, 2004). Esta análise permite determinar o quanto de DNA foi amplificado em comparação a uma amostra padrão. Este padrão pode ser um simples controle de amplificação (PCR semiquantitativa), ou uma seqüência de DNA exógeno introduzido na reação em quantidades conhecidas e cuja seqüência também é amplificada pelos *primers* da seqüência-alvo, com a

diferença de produzir um tamanho de bandas diferente – PCR quantitativo competitivo (VIEIRA, 2006).

As técnicas quantitativas partem do princípio de que a sequência usada como controle da amplificação deve ser amplificada nas mesmas condições da sequência-alvo, podendo ser utilizada como parâmetro de quantificação dos produtos da PCR. Após a eletroforese, o gel é registrado eletronicamente (por *scanner* ou fotografia digital), e as bandas são analisadas por programas de densitometria ótica (VIEIRA, 2006).

3 A QUESTÃO

Estudos de prevalência usando PCR demonstraram que a proporção de cães transmissores assintomáticos (ou seja, cães infectados e assintomáticos capazes de infectar mosquitos) em uma população canina é subestimada se métodos de detecção não-moleculares são utilizados (LACHAUD *et al.*, 2002b). O desenvolvimento da técnica de PCR tem fornecido relevante acesso tanto para o diagnóstico de leishmanioses quanto para a determinação de espécies envolvidas na infecção (MATHIS & DEPLAZES, 1995; REALE *et al.*, 1999; REITHINGER *et al.*, 2000, 2002, 2003; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; SUNDAR & RAI, 2002).

O diagnóstico molecular independe do estado imune, sendo um teste direto que investiga a presença do DNA do parasito na amostra. Tem sido proposto que este método é seguro e que pode ser empregado para diagnóstico precoce e prevenir a disseminação da infecção. Além disso, pode ser possível usá-lo em estudos epidemiológicos com finalidade de determinar a real prevalência em áreas em que a doença não tem sido controlada (REALE *et al.*, 1999).

O município de Raposa (Maranhão, Brasil) dista 28 Km do município de São Luís, capital do Estado do Maranhão, e apresenta uma área territorial de 64 Km², com uma população humana estimada em 20.698 habitantes (IBGE, 2005) distribuídos em 42 localidades. Uma delas, Vila Nova, é uma das mais antigas do município e agrega vários fatores que favorecem 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). No período de 1997 a 2005, foram registrados no município 159 casos, sendo 49 destes correspondentes à Vila Nova (SOARES, 2006).

Neste município, cães são considerados o principal reservatório da leishmaniose, onde também se observa um mosaico no perfil ambiental, com áreas de vegetação de transição e área urbana, além da presença do vetor, favorecendo a manutenção da doença. Diante da necessidade de mais esclarecimentos sobre a dinâmica da doença em cães naturalmente infectados e seu papel na manutenção da doença, investigou-se a carga parasitária por análise de DNA em diferentes tecidos de cães soropositivos para leishmaniose e sua associação com a fase clínica da doença.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a associação entre a carga parasitária de *L. chagasi* em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados e a manifestação clínica da doença.

4.2 ESPECÍFICO

Detectar o protozoário *Leishmania (L.) chagasi* e determinar a carga parasitária através da técnica de PCR quantitativa em cinco tecidos de cães naturalmente infectados;

Comparar a carga parasitária de *Leishmania (L.) chagasi* nas diferentes amostras de tecidos de cães infectados;

Comparar a carga parasitária das amostras de tecidos dos cães de acordo com a fase clínica da infecção.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Área

O município de Raposa está situado na ilha de São Luís, na zona do Golfão Maranhense, norte do estado do Maranhão. Limita-se ao norte e a oeste com o Oceano Atlântico e ao sul e a leste com o município de Paço do Lumiar (Figura 1). Segundo a classificação de Köppen, o clima é tropical e chuvoso (tipo Aw'). A temperatura média anual é de 28°C e o regime das chuvas é caracterizado pela divisão do ano em dois grandes períodos bem distintos: o período chuvoso (janeiro a junho) e o período seco (julho a dezembro) apresentando precipitação pluviométrica média anual de 1.600mm e umidade relativa do ar entre 60 a 80%. A altitude média é de 5m nas partes mais baixas e 15m nas dunas e nas proximidades dos córregos e vales, embora grande parte encontre-se submersa em água salgada. A hidrografia do município é constituída por praias, lagos e pequenos rios, como o rio Pimenta. Dentre

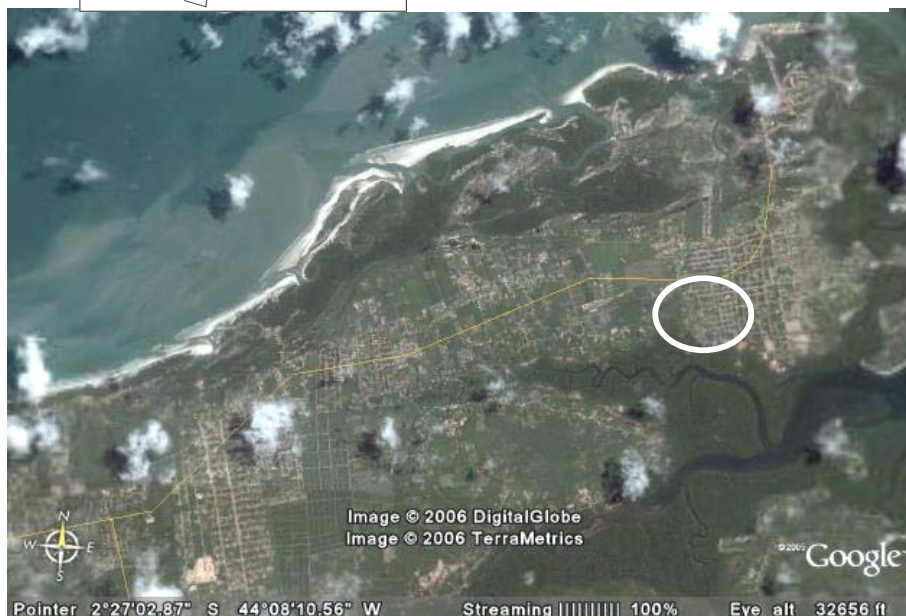
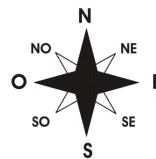
as praias destacam-se Araçagi, Raposa, Carimã, Curupu e Belizário. A cobertura vegetal encontra-se bastante modificada, predominantemente constituída por capoeiras (floresta secundária) e fisionomicamente ainda é marcada pela presença de babaçuais e manguezais (AB'SABER, 1986; IBAMA, 1991; DIAS *et al*, 2003).

5.2 Desenho do estudo

Foi realizado, de fevereiro a abril de 2005, censo dos cães domiciliados na localidade de Vila Nova, através de entrevistas domiciliares, sendo identificados 233 animais. Após esclarecimento e assinatura do termo de consentimento, o proprietário respondeu a um breve questionário com dados sobre sexo, idade, grau de confinamento e tipo de alimentação do cão, presença de outros animais domésticos, além da observação de ectoparasitismo (anexo 1). Foi realizada, neste período, coleta de sangue desses animais para sorodiagnóstico, que revelou 69 (29,6%) cães positivos para leishmaniose (ALMEIDA, 2006). O Centro de Controle de Zoonoses de São Luís realizou, então, busca ativa para recolhimento dos animais infectados, sendo vinte e sete cães foram reencontrados, recolhidos e incluídos neste estudo após consentimento dos seus proprietários.



A



B

Figura 1. Área de estudo: **A**- Mapa da localização geográfica do município de Raposa; **B**- Imagem aérea do município de Raposa-MA. Em destaque localidade de Vila Nova e rodovia MA-203 (linha amarela). Fonte adaptada: Software Google Earth/2006 *In*: SOARES, 2006.

5.2.1 Caracterização dos cães

Dentre os 233 cães domiciliados em Vila Nova, 123 eram machos (52,8%) e 110 fêmeas (47,2%). A maioria desses cães (94,4%) era sem raça definida (SRD); raças como Poodle, Pequinês, Fila e Pastor Alemão corresponderam juntos a 5,6% dos cães. Dos 69 animais positivos por sorologia, 40 eram machos (58%) e 29 fêmeas (42%). Dentre os soropositivos, aqueles sem raça definida corresponderam a 97,1% do total. Em relação à idade, o maior percentual de animais não-infectados (n=164) correspondia a cães jovens com faixa etária entre 0 a 2 anos. Entre os soropositivos, o maior percentual estava entre cães na faixa etária entre 2 e 4 anos. A maioria dos 233 cães amostrados (78%) convivia com outros animais, sendo os mais citados: gato, galinha e cão. Mais da metade dos 233 cães (55,4%) apresentava ectoparasitos no corpo e eram criados confinados na área peridomiciliar (59,6%).

5.3 Avaliação Clínica

Os 27 cães recolhidos foram clinicamente classificados em três fases distintas, de acordo com os critérios propostos por MANCIANTI *et al.* (1988), MOLINA *et al.* (1994) e também aqueles que são adotados no manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral do MINISTÉRIO DA SAÚDE (2003): “assintomático”, sem sinal clínico da doença; “oligossintomático”, com até dois sinais clínicos; “polissintomático”, com três ou mais sinais clínicos sugestivos da doença.

5.4 Amostras dos tecidos

Após avaliação clínica, os cães foram pré-anestesiados com Cloridrato de xilasina (Kensol®), para coleta das amostras. O sangue (5ml) foi coletado da veia tibial dorsal com auxílio de um escalpe e transferido para tubos vacutainer com EDTA. Após a coleta deste tecido, seguiu-se a eutanásia dos cães, de acordo com o recomendado pela Resolução nº 714/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, para então prosseguir a coleta das amostras de pele, medula óssea, baço e linfonodo poplíteo. Previamente à coleta de todos os tecidos, foi realizada assepsia (com água, sabão e etanol 70%) das áreas de coleta e incisão, incluindo raspagem dos pêlos. Cada cão foi amostrado com diferentes instrumentos a fim de evitar contaminação entre suas amostras, bem como entre as amostras de outros cães.

Amostras de medula (0,5 – 1,0mL) foram obtidas através do aspirado do esterno, usando-se seringas de 20mL, transferidas para tubos vacutainer com EDTA e estocadas a -20°C. Amostras de pele saudável da orelha foram obtidas com o auxílio de “punch” para biópsia, com diâmetro de 5 mm e imediatamente acondicionadas e estocadas, conforme LACHAUD *et al.* (2002b). Baço e linfonodo foram removidos completamente e acondicionados em frascos estéreis contendo solução de soro fisiológico com penicilina e estreptomicina.

5.4.1 Extração de DNA das amostras

Sangue: as amostras (n=27) foram transferidas para tubos tipo Falcon (15mL), ressuspendidas em solução salina (NaCl 0,9%) e centrifugadas por 10min a 2500rpm. O *pellet* foi lavado por três vezes consecutivas com solução de lise de

hemácias (Sacarose 5mM; Tris-HCl 10mM [pH 7,5]; MgCl₂ 5mM; triton X-100 1%) com centrifugação por 10min a 2500rpm e lavado uma vez com solução de lise nuclear (Tris 10mM; EDTA [pH 8,0]; NaCl 10mM) e posteriormente incubado overnight a 37°C com proteinase K (10mg/mL). A seguir, processou-se a extração com o método de fenol-clorofórmio, segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001).

Medula óssea, baço e linfonodo poplíteo: a extração do DNA desses tecidos foi realizada utilizando-se o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguindo-se o protocolo do fabricante. Amostras de baço e linfonodo foram previamente trituradas para facilitar o processo de extração. O total de amostras desses tecidos disponíveis para a extração foi variável (medula, n=26; baço, n=23; linfonodo, n=15).

Pele: as amostras (n=27) foram previamente picotadas com lâminas descartáveis e transferidas para tubos eppendorf (1,5mL). Foram adicionados 430µL de TLN (NaCl 400mM; Tris-HCl 25mM [pH=8,0]; EDTA 50mM [pH=8,0]), 30µL de proteinase K (10mg/mL) e 40µL de Sulfato duodecil de sódio (SDS) 10%. Os tubos foram encubados em banho-maria a 55°C overnight, quando foram resfriados em gelo. Em seguida, foram adicionados 500µL de fenol, 250µL de Tris-HCl (pH=8,0) e 250µL de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 10000rpm por 10min e, em seguida, resfriadas em gelo. Foram transferidos 700µL do sobrenadante para outro tubo, completando-se o volume para 1,5mL com etanol absoluto. Os tubos foram mantidos por 24h a -20°C para precipitação do *pellet* e centrifugado a 15000rpm por 10min. O *pellet* foi lavado com etanol 75% e centrifugado mais uma vez a 15000rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi deixado secar à temperatura ambiente e posteriormente ressuspensão em 50µL de água ultrapura. O DNA extraído

de todas as amostras foi mensurado por densidade óptica a 260nm utilizando espectrofotômetro (Ultrospec 1100pro, Amersham Biosciences).

5.5 Extração de DNA de cepa de *L. chagasi* (controle positivo)

Foram coletados 5mL da cultura da cepa de *L. chagasi* (MHOM/BR2000/MER2), aos quais foram acrescentados 7mL de solução salina (NaCl 0,9%). A suspensão foi centrifugada a 3500rpm por 5min, sendo o sobrenadante descartado. O *pellet* extraído foi deixado secar a temperatura ambiente e depois foi ressuspensionado em 50µL de água ultrapura.

Para calcular o número de parasitas no controle positivo, foram estimados $2,1 \times 10^7$ parasitas em 1mL da cultura de *L. chagasi*. Portanto, em 5mL da cultura, havia aproximadamente $1,05 \times 10^8$ parasitas. A extração do DNA foi feita a partir desse número de parasitas, sendo obtido 620ng de DNA. A absorbância foi medida em espectrofotômetro GeneQuant Pro (Pharmacia Biotech) à 260nm e 280nm. Este resultado serviu como base para o cálculo do número de parasitas nas alíquotas das diluições do controle.

5.6 Testes de sensibilidade e de inibição

A sensibilidade da PCR quantitativa foi avaliada realizando-se amplificação do DNA da cepa de *L. chagasi* em diluições seriais decimais de 100.000 a 1 parasita. Foi realizado o teste de inibição da reação pelo DNA genômico do animal parasitado, acrescentando-se 50ng de DNA de sangue de cão saudável e negativo para

leishmaniose visceral, a cada reação com diluições seriadas do controle positivo (DNA da cepa).

5.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Oligonucleotídeos específicos, *primers* RV1 e RV2 (LACHAUD *et al.*, 2002a, b), foram utilizados para amplificação da região conservada do minicírculo do cinetoplasto. A PCR foi conduzida em uma mistura de reação com volume final de 20µL que continha: Tampão (10x); 1,5mM de MgCl₂; 200mM de cada nucleotídeo; 1U *Taq* polimerase (Invitrogen); 5pmol (10µM) de cada *primer*; 1µL (50ng) de DNA da amostra e água. Os ciclos para amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 5min; 34 ciclos a 94°C por 30s, 59°C por 30s, 72°C por 30s; e extensão final a 72°C por 10min. Controles positivos contendo DNA de *L. chagasi* e controles negativos (água) foram incluídos em cada reação.

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (10mg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta. As amostras foram consideradas positivas para *L. chagasi* ao se detectar a amplificação do produto de 145pb (Figura 2).

O gel foi registrado eletronicamente por sistema de fotodocumentação e as bandas foram analisadas através do programa de densitometria ótica ImageJ Copyright© 2006 (Sun Microsystems, Inc.). Trata-se de um programa de código aberto (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) que analisa a densitometria das bandas obtidas,

gerando uma curva, cujos picos representam as regiões de maior densidade ótica, os quais são transformados, através de equações integrais, em valores numéricos.

Para as análises quantitativas, todas as amostras foram processadas em duplicata e os valores obtidos foram registrados como média daqueles obtidos em cada ensaio. Utilizou-se para cada amostra processada, 10pmol de GAPDH (*sense* – CTGCACCACCCACTGCTTAGC; *antisense* – CAGTGAGCTTCCCGTTCAGC) como controle interno da reação.

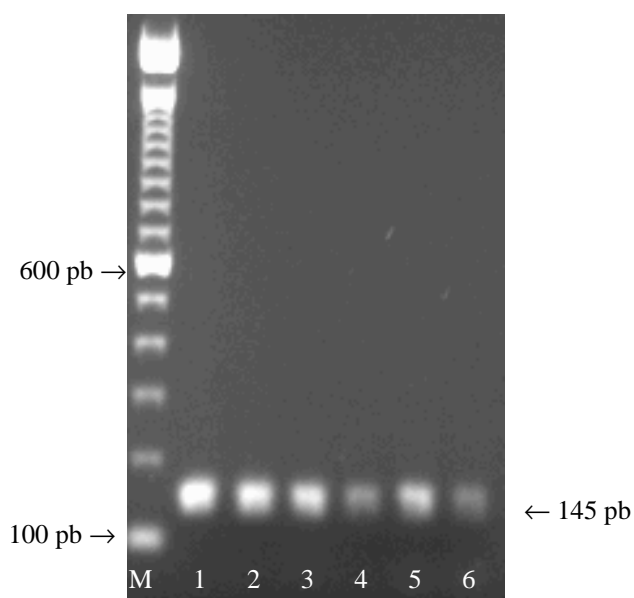


Figura 2. Gel de agarose a 1,5% mostrando produto de kDNA de *L. chagasi* com 145 pb (colunas 1 a 6) e marcador de peso molecular (M) de 100 pb.

5.8 Cálculo da carga parasitária em amostras de tecidos

O cálculo (anexo 2) para determinação da carga parasitária de *L. chagasi* foi realizado segundo o método proposto por MARIN *et al* (2002) com modificações,

com base na comparação da densidade óptica (D.O.) da banda do produto amplificado da amostra no gel de agarose com as bandas das diluições da cepa (controle positivo).

Foi calculado primeiramente o intervalo entre as densidades das bandas do controle (mais diluído e mais concentrado). Em seguida, foi calculado o intervalo entre a banda da amostra e a banda do controle mais diluído. Então, por regra de três simples, foi determinada a proporção correspondente à posição da banda da amostra no intervalo entre a banda do controle mais concentrada e a mais diluída. Foi calculado o logaritmo do número de parasitas nas densidades ópticas correspondentes a cada diluição. Ao logaritmo do número de parasitas na alíquota mais diluída, foi somado o valor que corresponde ao percentual da diferença entre a amostra e a alíquota mais diluída. Também, ao logaritmo do número de parasitas na alíquota mais concentrada, foi subtraído o valor que corresponde ao percentual da diferença entre a amostra e a alíquota mais concentrada. O antilogaritmo dos resultados encontrados corresponde, pois, à carga parasitária da amostra, expressa como número de parasitas por microlitro de DNA da amostra.

5.9 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc.). Foi realizada a análise de variância ANOVA one-way para comparação dos valores de parasitismo entre os grupos (assintomático, oligossintomático e polissintomático) para cada tecido. Foi utilizada a correlação r de Pearson para avaliar a associação entre sinais clínicos da doença e a carga parasitária em cada tecido. Em todas as análises, os resultados foram considerados significativos para valores de $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação clínica e diagnóstico molecular

Do total dos cães soropositivos (n=27) recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, apenas um apresentava raça definida (poodle). Em relação ao sexo, a amostra ficou eqüitativamente dividida, sendo 13 machos e 14 fêmeas. A idade dos animais variou de 8 meses a 9 anos, estando a maioria (n=15) concentrada na faixa etária entre 2 e 4 anos.

De acordo com a avaliação clínica, dez cães foram classificados como assintomáticos (AS); oito como oligossintomáticos (OS) e nove como polissintomáticos (PS). A presença de DNA do parasito foi detectada em todos os 27 cães, em pelo menos um tecido amostrado. Os resultados do diagnóstico molecular nos diferentes tecidos foram comparados na Figura 3, onde se observa que o linfonodo (L) foi o tecido que apresentou a porcentagem máxima de positividade, seguido por baço (B), sangue (S), medula (M) e pele (P).

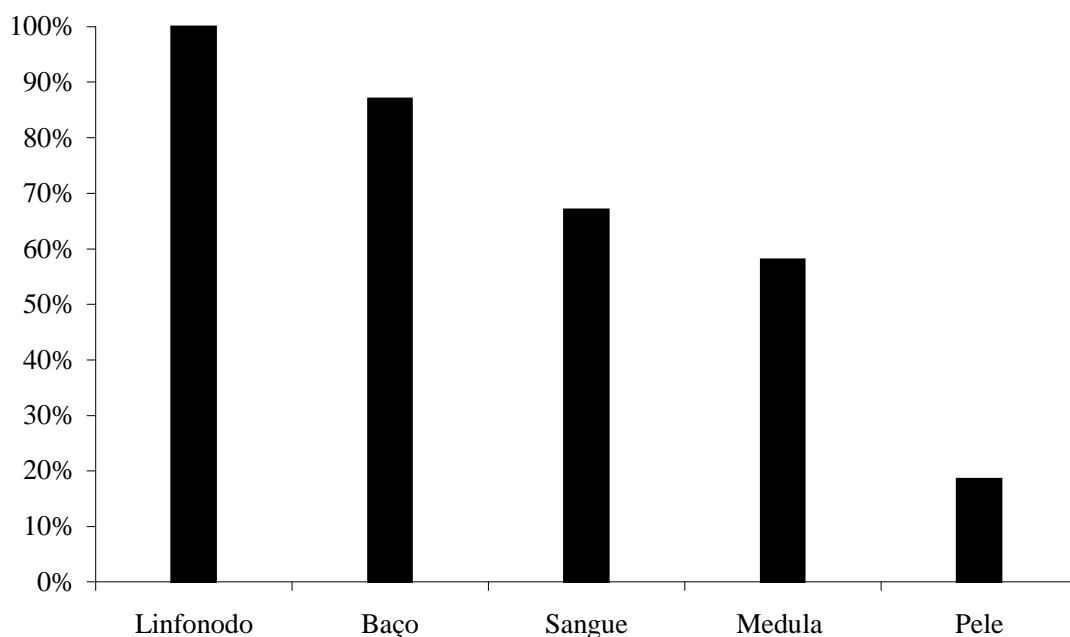


Figura 3. Percentual de positividade para DNA de *Leishmania* em cinco diferentes tecidos analisados em cães com diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral.

Comparando-se os resultados de positividade nos diferentes tecidos de acordo com a classificação clínica, observa-se na Tabela 1 que: (i) o maior percentual de positividade no sangue ocorreu em cães polissintomáticos, o que também pode ser observado para medula; (ii) baço apresentou a segunda maior taxa de positividade tanto em cães assintomáticos quanto em cães oligossintomáticos, alcançando positividade máxima entre cães polissintomáticos; (iii) linfonodo foi o único tecido com 100% de positividade em todas as fases clínicas; (iv) pele foi o tecido com as menores taxas percentuais, apresentando positividade apenas para um cão assintomático.

Tabela 1. Número de amostras positivas para DNA de *Leishmania chagasi* em cada tecido de cães com diagnóstico sorológico para leishmaniose canina de acordo com a fase clínica da doença.

Fase Clínica	Nº. de amostras positivas/total amostras (% positividade)				
	Linfonodo	Baço	Sangue	Medula	Pele
Assintomático	4/4 (100%)	8/9 (88,9%)	6/10 (60%)	3/9 (33,3%)	1/10 (10%)
Oligossintomático	6/6 (100%)	5/7 (71,4%)	5/8 (62,5%)	5/8 (62,5%)	4/8 (50%)
Polissintomático	5/5 (100%)	7/7 (100%)	7/9 (77,8%)	7/9 (77,8%)	3/9 (33,3%)
Total de amostras	15	23	27	26	27

Ainda com relação à Tabela 1, comparando-se as taxas percentuais de positividade nos tecidos entre as fases clínicas, percebe-se a seguinte relação: (i) entre assintomáticos: L>B>S>M>P; (ii) entre oligossintomáticos: L>B>S=M>P; (iii) entre polissintomáticos: L=B>S=M>P.

Em animais assintomáticos (n=10), nove foram positivos para pelo menos um tecido, enquanto apenas um cão foi positivo para quatro tecidos. No grupo dos cães sintomáticos (n=17), quatorze foram positivos para pelo menos três tecidos, sendo a associação mais comum entre os tecidos sangue, baço e linfonodo. Apenas um cão polissintomático apresentou positividade para os cinco tecidos analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Número absoluto de cães com resultado positivo para amplificação de DNA de *Leishmania chagasi* nos cinco tecidos^(*) de acordo com a fase clínica da doença.

Tecidos	Estado Clínico		Total
	Assintomático	Sintomático (OS e PS)	
S	1	0	1
B	2	0	2
L	1	0	1
S/B	2	1	3
M/B	0	1	1
M/L	0	1	1
S/M/B	1	2	3
S/B/L	1	4	5
M/B/L	1	2	3
S/M/P	0	2	2
M/L/P	0	1	1
S/M/B/L	1	1	2
S/M/L/P	0	1	1
S/M/B/L/P	0	1	1
Total	10	17	27

^(*) Sangue (S), Baço (B), Linfonodo (L), Medula (M) e Pele (P).

6.2 Carga parasitária

Nos testes de sensibilidade e de inibição, obtivemos bandas em diluições com até 10 parasitas (Figura 4). A curva-padrão gerada a partir da leitura das densidades ópticas correspondentes às diluições seriais da cepa (controle positivo) encontra-se na Figura 5.

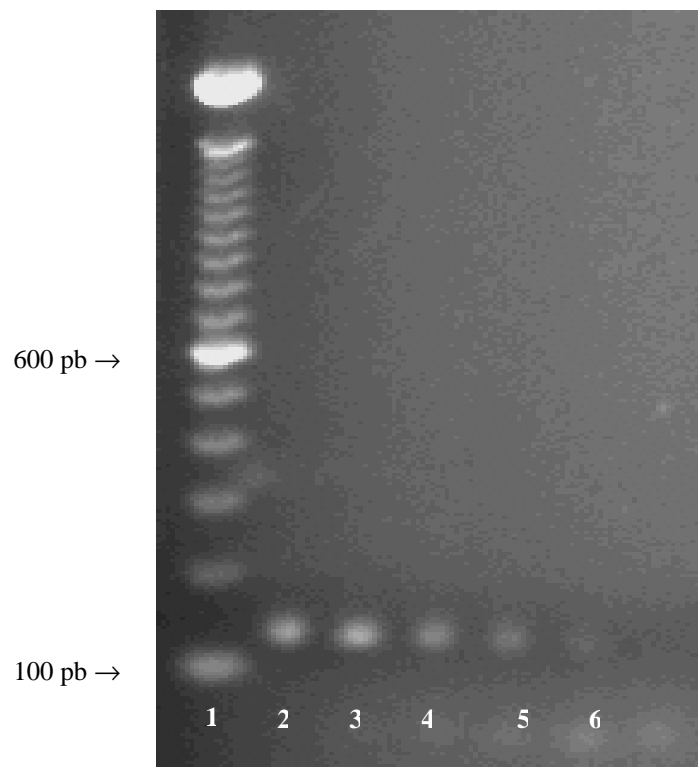


Figura 4. Produtos de amplificação (145pb) obtidos com diferentes diluições do parasita (*L. chagasi*). Coluna 1: marcador de peso molecular de 100pb; coluna 2: 1×10^5 parasitas; coluna 3: 1×10^4 parasitas; coluna 4: 1×10^3 parasitas; coluna 5: 1×10^2 parasitas; coluna 6: 10 parasitas.

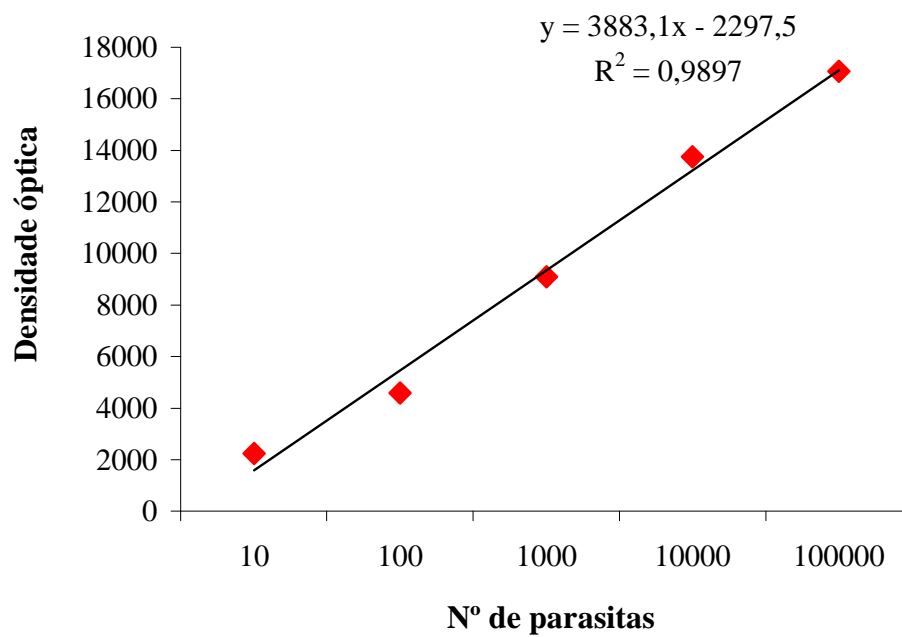


Figura 5. Curva-padrão (regressão linear) obtida a partir da leitura das densidades ópticas dos produtos amplificados das diluições seriais de kDNA da cepa de *L. chagasi*.

Quando investigada a relação entre carga parasitária por tecido e as fases clínicas da doença, verificou-se diferença ($p < 0,05$) entre os grupos oligossintomático e polissintomático nas amostras de linfonodo. Para os demais tecidos, não foi observada diferença significativa entre os grupos analisados (Figura 6). Por outro lado, a correlação entre o número de sinais clínicos e o número de parasitas, avaliada pela correlação r de Pearson, foi significativa ($p < 0,05$) para amostras de linfonodo, baço e sangue (Figuras 7A, 7B, 7C).

Entre cães assintomáticos e oligossintomáticos, as maiores cargas parasitárias foram observadas em amostras de linfonodo e baço, enquanto entre polissintomáticos, observou-se alta carga parasitária em todos os tecidos, à exceção de pele. Contudo, em um cão polissintomático, a carga parasitária observada em amostra de pele superou a observada para cães oligossintomáticos e assintomáticos. Para amostras de medula, as maiores cargas parasitárias foram observadas em cães polissintomáticos, ao contrário do observado em cães assintomáticos e oligossintomáticos (Figura 6).

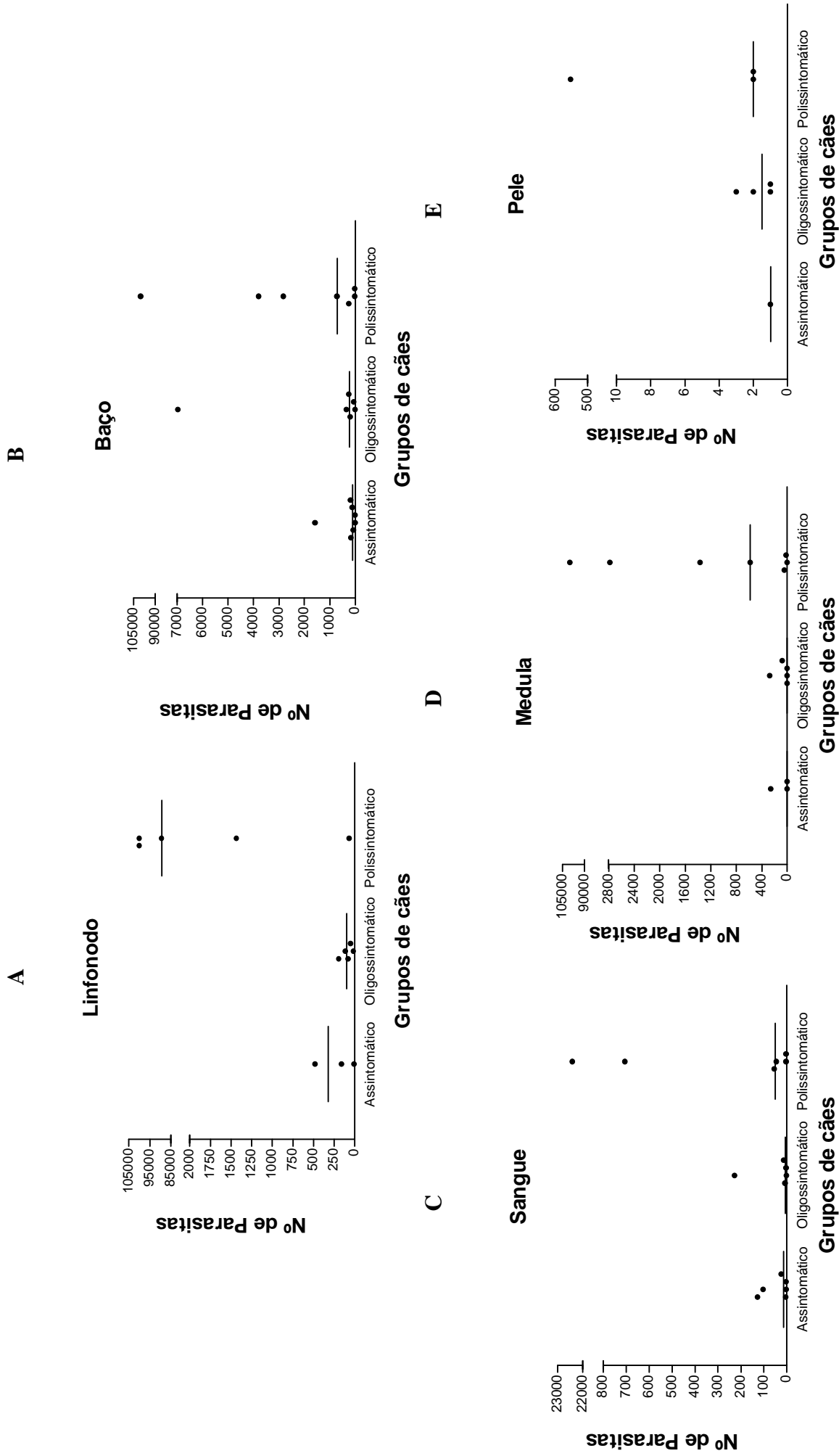


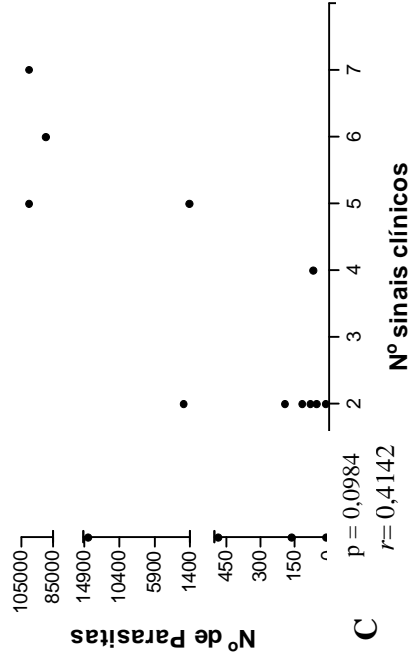
Figura 6. Carga parasitária em cada tecido de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* de acordo com a fase clínica da doença. Linfonodo (A), Baço (B), Sangue (C), Medula (D) e Pele (E).

p = 0,014

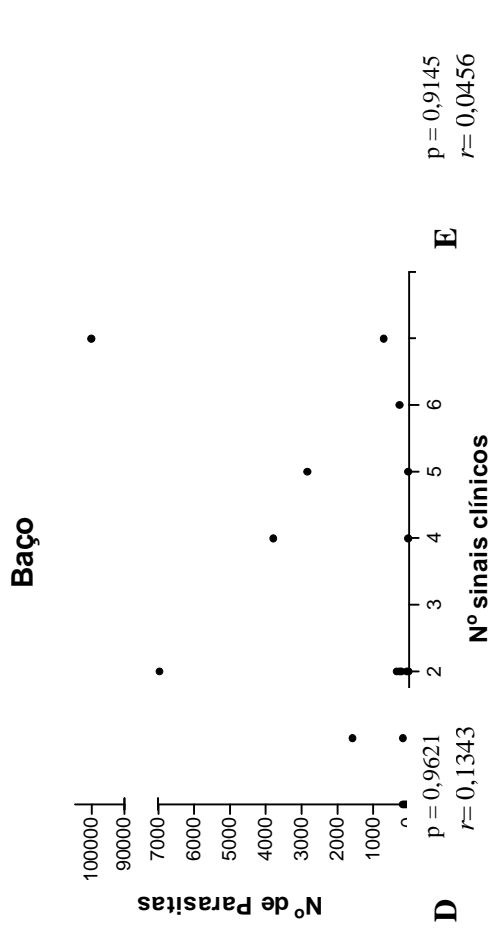
48

p = 0,048

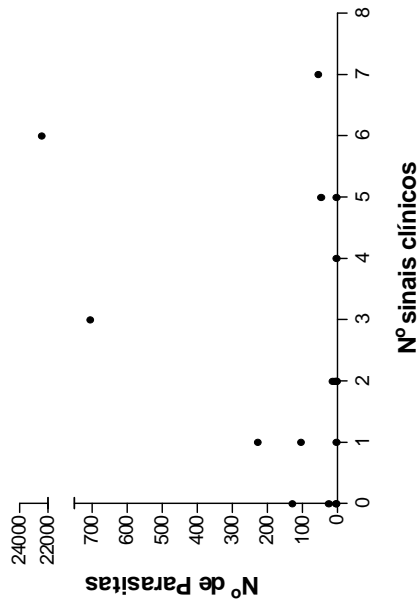
A $r = 0,7465$



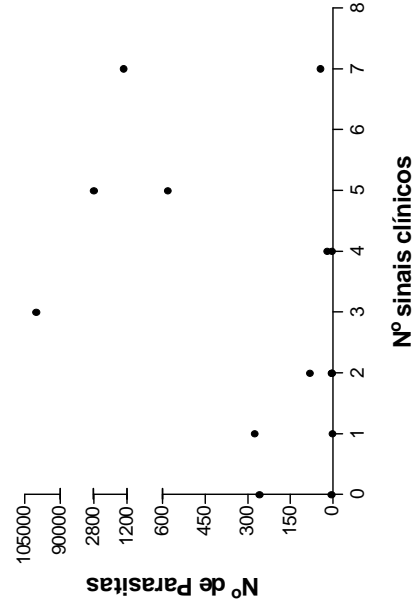
B $r = 0,4473$



Sangue



Medula



Pele

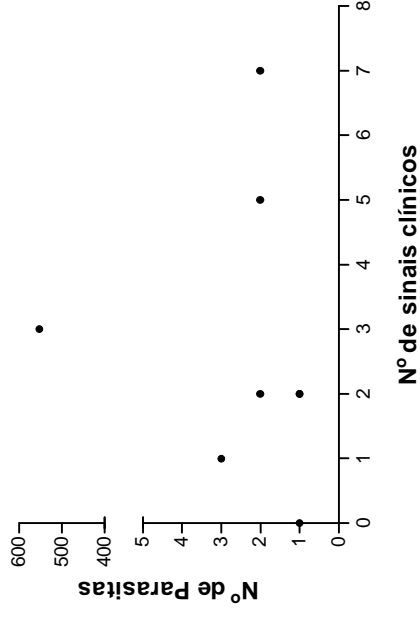


Figura 7. Carga parasitária em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* de acordo com número de sinais clínicos apresentado pelos animais. Linfonodo (A), Baço (B), Sangue (C), Medula (D) e Pele (E).

7 DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste trabalho foram obtidos a partir de um estudo pioneiro de investigação da relação entre a carga parasitária de *L. chagasi*, em cães naturalmente infectados, e as fases clínicas da leishmaniose visceral canina, avaliada através de um método de PCR quantitativa, e vem somar informações para a construção do entendimento sobre a dinâmica da doença em áreas endêmicas.

Uma das problemáticas no avanço do entendimento sobre o curso da infecção canina deve-se à grande variabilidade entre os estudos conduzidos quanto à técnica utilizada, ao estágio de desenvolvimento da doença, ao material coletado, ao tipo de infecção (natural ou experimental) e quanto à espécie do parasito com a qual o animal foi infectado.

A leitura das densidades das bandas eletroforéticas obtidas pela PCR das amostras, bem como a banda da cepa controle, é o principal ponto crítico da técnica quantitativa proposta. A fim de evitar os vieses previstos, foram padronizados e mantidos constantes os seguintes fatores: concentração da agarose, espessura dos géis, concentração da solução-tampão, quantidade do produto amplificado aplicado no gel, solução de brometo de etídio e fotodocumentação. Para a análise das bandas, utilizou-se sempre os mesmos equipamentos e os mesmos parâmetros foram observados, bem como cálculos lógicos para determinação dos valores de parasitismo. Em nosso trabalho, todas as reações de PCR foram realizadas em duplicata, assegurando-se a reprodutibilidade dos resultados.

Os dados relativos à presença do parasito nos diferentes tecidos estudados, em especial na pele, confrontam-se com os dados da literatura (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2006). Em nossos resultados a pele, sem lesão e livre de contaminantes de sangue, foi o tecido que apresentou a menor positividade e a menor carga parasitária em comparação aos outros tecidos analisados. Em contrapartida, o linfonodo apresentou-se como um dos maiores sítios de parasitismo dentre os tecidos analisados. Estes resultados podem ser justificados pela resposta imunológica do hospedeiro, pois após a fagocitose dos parasitas pelos macrófagos, estes são drenados por via linfática para os linfonodos, com posterior disseminação para outros órgãos (CARDOSO & CABRAL, 1998).

SOLANO-GALLEGO *et al.* (2001), investigando por meio de PCR a infecção canina por *L. infantum*, sugeriram que a pele seria o melhor tecido de reserva deste parasito em cães, principalmente em assintomáticos, devido ser a pele o melhor tecido de acesso para o vetor. REIS *et al.* (2006), utilizando ensaios imunológicos, também sugeriram que a pele seria um dos melhores tecidos para investigação de parasitismo por *L. chagasi*, pois encontraram neste tecido um dos maiores sítios de parasitismo.

Estudos em focos endêmicos de leishmaniose canina indicam que pelo menos 50% dos cães naturalmente infectados não apresentam sinais clínicos da doença, tendo sido sugerido que as populações caninas assintomáticas não transmitiriam o parasito aos vetores (MANCIANTI *et al.*, 1986, ABRANCHES *et al.*, 1991, CABRAL *et al.*, 1992, ALVAR *et al.*, 1994, DYE, 1992 *apud* CARDOSO & CABRAL, 1998). No entanto, MOLINA *et al.* (1994), por meio de xenodiagnóstico, obtiveram três resultados positivos em cinco cães em fase assintomática, e afirmam

que estes podem ser fontes de infecção para os vetores tal como os cães sintomáticos. BERRAHAL *et al.* (1996 *apud* ABRANCHES *et al.*, 1998), utilizando a técnica de PCR, obtiveram nove testes positivos em amostras de pele de quatorze cães assintomáticos. Em contrapartida, ABRANCHES *et al.* (1998) relatam que tanto nas experiências de infecção natural quanto nas experimentais, a presença de amastigotas na pele é uma raridade. Fato também observado em nossos resultados, pois dentre os dez cães assintomáticos, apenas um apresentou positividade para amostra de pele.

Em nosso trabalho observamos também uma menor porcentagem de positividade em tecido medular em comparação aos resultados de linfonodo e baço, principalmente entre cães assintomáticos. Tem sido sugerido que a baixa positividade em medula está relacionada à disseminação hematogena e que esta só ocorre em parte dos animais infectados (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001). ASHFORD *et al.* (1995) sugeriram que para amostras de medula, a reação de amplificação do DNA é uma técnica mais apropriada do que sorologia. LACHAUD *et al.* (2002b) descreveram a PCR em amostras de medula como sendo não menos sensível que PCR de amostras de linfonodo. Por outro lado, SOLANO-GALLEGO *et al.* (2001) encontraram baixa porcentagem de positividade em medula (17%). REIS *et al.* (2006) chamam atenção aos seus resultados obtidos para medula através de ensaios imunológicos que apresentou menor densidade parasitária entre cães assintomáticos em comparação aos grupos oligossintomáticos e polissintomáticos.

Nossos dados demonstram que linfonodo e baço são os dois melhores tecidos para diagnóstico da infecção, pois ambos apresentaram os maiores percentuais de positividade, inclusive em todos os grupos de classificação clínica (AS, OS, PS). Outros autores também sugeriram que linfonodo e baço são os melhores tecidos para

diagnóstico da infecção através de técnicas sorológicas e de cultura (REALE *et al.*, 1999; LACHAUD *et al.*, 2002b; BARROUIN-MELO *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2006).

Em relação às amostras de sangue, apresentamos dados contrastantes com os de REITHINGER *et al.* (2002), que obtiveram 100% de positividade em amostras de sangue tanto por PCR quanto por ELISA. Nossos resultados corroboram com aqueles encontrados por REALE *et al.* (1999), nos quais a positividade nesse tipo de tecido foi menor do que em linfonodo. Assim, apesar da coleta de sangue ser menos invasiva do que a coleta de aspirado de medula, baço ou linfonodo, é notória a sua baixa positividade em cães infectados. LACHAUD *et al.* (2001) ressaltam também que esse tecido pode conter inibidores de PCR que podem afetar a sensibilidade da técnica.

Neste trabalho, observamos a seguinte relação de positividade de modo decrescente, de acordo com o tecido avaliado, entre os cães classificados clinicamente: (i) AS: L>B>S>M>P; (ii) OS: L>B>S=M>P; (iii) PS: L=B>S=M>P. A maior positividade encontrada em linfonodo nas três classes clínicas pode ser justificada pela migração dos macrófagos para esse tecido após englobamento do parasito, além da multiplicação inicial da *Leishmania* neste local antes de migrar para outros tecidos. O fato de o baço apresentar positividade maior do que o sangue está relacionado à tendência de comportamento viscerotrópico observado em *L. chagasi*, além do que, como já discutido anteriormente, o sangue pode apresentar positividade menor devido a inibidores de PCR.

A respeito da leishmaniose visceral, pouco se conhece sobre o curso da infecção canina e as características do desenvolvimento da patologia ainda não foram completamente investigadas. De acordo com FERNANDES (2006), alguns estudos

indicam uma grande heterogeneidade de resposta à infecção experimental em cães, dependendo do número de parasitas inoculados e da via de inoculação. Em cães naturalmente infectados, a imunidade celular, quando presente, é capaz de controlar a infecção e o animal permanecer assintomático. A alta taxa de infecção determinada por análise molecular e a demonstração de imunidade celular confirmam que a presença do parasito não significa, necessariamente, infecção ativa, e que um amplo espectro de manifestações podem estar associadas, como ocorre na infecção humana. Entretanto, segundo CARDOSO & CABRAL (1998) as alterações dermatológicas são bastante freqüentes em animais com leishmaniose visceral e podem ocorrer na ausência de outros sinais clínicos. Animais com estas alterações possuem, também, envolvimento sistêmico, pois os parasitos geralmente disseminam por todo o corpo antes do aparecimento das lesões de pele.

A manutenção do caráter endêmico da leishmaniose visceral em nossa área de estudo pode estar relacionada à presença de cães assintomáticos por um longo período de tempo, mesmo não sendo estes cães, durante essa fase clínica da doença, fonte de infecção para o vetor, mas contribuindo para a manutenção da presença do parasito na área. Cães assintomáticos, ao contrário dos polissintomáticos, só são retirados do convívio com humanos após o diagnóstico realizado em campanhas do Centro de Controle de Zoonoses. Ademais, a alta taxa de migração dos moradores entre as localidades do município dificulta o recolhimento do animal infectado da área, além da objeção do proprietário ao saber que deve entregar um animal sem sinais clínicos ao recolhimento, por vezes escondendo-o ou doando-o a outra pessoa.

Dessa forma, estes cães assintomáticos após um período variável de tempo, como já descrito na literatura, podem passar a ter capacidade de infecção ao vetor, garantindo a perpetuação do ciclo biológico do parasito, podendo este ser

transmitido acidentalmente ao homem, uma vez que esses cães convivem no ambiente peridomiciliar e até mesmo domiciliar, constituindo-se um dos chamarizes de fonte alimentar para a fêmea de *Lutzomyia longipalpis*.

Mais esclarecimentos sobre o espectro da doença e o desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose visceral canina constituem-se em um amplo campo de investigação científica. Estudos adicionais são ainda necessários para se conhecer melhor a resposta imune durante o curso da leishmaniose em cães naturalmente infectados. Tais estudos representam um passo essencial para se estabelecer critérios para a seleção de formulações, sejam elas vacinais ou medicamentosas, necessárias para o desenvolvimento e manutenção de proteção. Estes aspectos são pontos críticos para a redução das taxas de transmissão e controle da doença.

O uso de métodos moleculares, como desenvolvido neste trabalho, além de propiciar maior sensibilidade e segurança no diagnóstico da leishmaniose visceral, permite a realização de estudos de interesse epidemiológico, uma vez que pode ser empregado no diagnóstico precoce da infecção, auxiliando nas medidas de controle, assim como pode ser uma ferramenta a mais utilizada na elucidação do curso e desdobramento da infecção, principalmente no esclarecimento acerca da importância epidemiológica dos cães assintomáticos em áreas endêmicas, podendo-se utilizar a técnica de determinação da carga parasitária concomitantemente ao teste de xenodiagnóstico, e assim caracterizar um padrão mínimo de carga parasitária que confira capacidade de infecção ao vetor.

8 CONCLUSÕES

A sensibilidade da técnica quantitativa (10 parasita/ μ l de DNA) mostrou-se adequada ao diagnóstico precoce da infecção por *L.chagasi* e à investigação sobre carga parasitária a qual o hospedeiro está submetido.

Os resultados apresentados em nosso estudo sugerem que os melhores tecidos para diagnóstico da infecção canina por *Leishmania (Leishmania) chagasi* são linfonodo e baço, sendo que linfonodo se mostrou o tecido mais indicado para diagnóstico de LVC, inclusive em cães assintomáticos, fato importante a ser considerado em estudos epidemiológicos para controle da doença, principalmente em áreas endêmicas, como é o caso do município de Raposa, no estado do Maranhão, Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P., SILVA-PEREIRA, M. C. D., CONCEIÇÃO-SILVA, F. M., SANTOS-GOMES, G. M., JANZ, J. G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, v. 77, p. 557-561, 1991.
- ABRANCHES, P., CAMPINO, L., SANTOS-GOMES, G. M. Leishmaniose Canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da Leishmaniose Visceral Humana. **Acta Medica Portuguesa**, v. 11, p. 871-875, 1998.
- AB'SABBER, A. N. Geomorfologia da região. *In*: ALMEIDA JÚNIOR, M. G. **Carajás: desafio político e desenvolvimento**. Editora Brasiliense, 1986, p. 88–124.
- ALMEIDA, J. F. Soroprevalência de leishmaniose visceral canina e relação entre subclasses de IgG e sintomatologia clínica. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2006.
- ALENCAR, J. E. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará**, v. 17, 129-148, 1977.
- ALTES, J., SALAS, A., RIERA, M., UDINA, M., GALMES, A., BALANZAT, J. BALLESTEROS, A., BUIADES, J., SALVA, F., VAILALONGA, C. Visceral Leishmaniasis: another H.I.V. associated opportunistic infection? Report of eight cases and review of literature. **AIDS**, v. 5, p. 201-207, 1991.
- ALVAR, J., CANAVATE, C., GUTIERREZ-SOLAR, B., JIMENEZ, M., LAGUNA, F., LOPEZ-VELEZ, R., MOLINA, R., MORENO, J. *Leishmania* and human

immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical Microbiology Review**, v. 10, p. 298-319, 1997.

ASHFORD, R. W., DESJEUX, P., DERAADT, R. P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 8, p. 103-104, 1992.

ASHFORD, D. A., BOZZA, M., FREIRE, M., MIRANDA, J.C., SHERLOCK, I., EULALIO, C., LOPES, U., FERNANDES, O., DEGRAVE, W., BARKER JR, R. H. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 53, p. 251-255, 1995.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal Parasitology**, v. 8, p. 1269-1281, 2000.

BADARÓ, R., JONES, T. C., CARVALHO, E. M., SAMPAIO, D., REED, S. G., BARRAL, A., TEIXEIRA, R., JOHNSON, W. D. J. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of infectious diseases**, v. 156, p. 1003-1011, 1986.

BARKER, D. C., GIBSON, L. J., KENNEDY, W. P. K., NASSER, A., WILLIAMS, R. H. The potential of using recombinant DNA species probes for the identification of tropical *Leishmania*. **Parasitology**, v. 91 (supl), p. 139-174, 1986.

BARROUIN-MELO, S. M., LARANJEIRA, D. F., JOELMA, T., PAULO, H. P. A., DOS-SANTOS, W. L. C., PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n.2, p. 195-197, 2004.

- BREWSTER, S., ASLETT, M., BARKER, D. C. Kinetoplast DNA minicircle database. **Parasitology Today**, v. 14 , n. 11, p. 437-438, 1998.
- BOZZA, M., FERNANDES, O., DEGRAVE, W. M. Characterization of “Old World” *Leishmania* species using amplified minicircle variable regions as molecular probes. **Transactions of the Royal Society Medicine and Hygiene**, v. 89, p. 333-334, 1995.
- CABRAL, M., O., A. J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs in Oporto, Portugal. **Parasite Immunology**, v. 14, p. 531-539, 1992.
- 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. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.
- 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 Luís-MA, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 445-451, 2001.
- CARDOSO, L., CABRAL, M. *Leishmania* e Leishmaniose canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 93, n. 527, p. 119-170, 1998.
- CATARSINI, O. Epidemiologia e manifestazione cliniche della leishmaniosi del cane. **Revista Parasitologica**, v. 44, p. 83-87, 1981.
- COSTA, J. M. L, VIANA, G. M. C., SALDANHA, A. C. R., NASCIMENTO, M. D. S. B., ALVIM, A. C., BURATTINI, M. N., SILVA, A. R. Leishmaniose Visceral

- no Estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 321-324, 1995.
- DEANE, L. M., DEANE, M. P. Encontro de leishmânias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital**. Rio de Janeiro, v. 45, p. 419-421, 1954.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinical Dermatology**, v. 14, p. 417-423, 1996.
- DIAS F.O.P., LOROSA E.S., REBELO J.M.M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Psychodidae: Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.
- FERNANDES, O., MUTHY, K. V., KURATH, U., DEGRAVE, W. M. & CAMPBELL, D. A. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 66, p. 261-271, 1994.
- FERNANDES, A. P. Imunidade a vacinas na leishmaniose visceral canina. *In.*: 1º Fórum sobre leishmaniose visceral canina. Anais eletrônicos. Jaboticabal, São Paulo, Março de 2006. Disponível em: http://www.cbpv.com.br/artigos/CBPV_Anais_1LVC.pdf.
- GARCIA, A. M. Estudo da infecção e doença no cão (*Canis familiaris*) por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em uma área endêmica na Ilha de São Luís-MA, Brasil. 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2004.
- GRADONI, L., SCALONE, A., GRAMICIA, M. HIV-*Leishmania* co-infections in Italy: serological data as a indication of the sequence of acquisition of two

infections. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 94-96, 1993.

GRIMALDI, G. J. R., TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 230-250, 1993.

HARISSON, L. H., NAIDER, T. G., DREW, J. S., DE ALENCAR, J. E., PEARSON, R. D. Reciprocal relationships between undernutrition and parasitic disease visceral leishmaniasis, **Review of Infectious Diseases**, v. 8, p. 447-453, 1986.

IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis).

Diagnóstico dos principais problemas ambientais do estado do Maranhão. São Luís-MA. Editora Litograf, 1991.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, p. 123-152, 1995.

KEMP, M., THEANDER, T. G., KHARAZMI, A. The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. **Immunology Today**, vol. 17, n. 1, p. 13-16.

KHARAZMI, A., CHEN, M., ZHAI, L., FROKJAER, S., THEANDER, T.G., CHRISTENSEN, S.B. Discovery, development and mechanism of action of never antiprotozoal oxygenated. **Tropical Medicine & International Health**, vol. 1, n. 6, p. A28-A29, 1996.

LACHAUD, L., CHABBERT, E., DUBESSAY, P., REYNES, J., LAMOTHE, J. & BASTIEN, P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **American Society for Microbiology**, v. 39, n.2, p. 613-617, 2001.

- LACHAUD, L., MARCHERGUI-HAMMAMI, S., CHABBERT, E., DEREURE, J., DEDET, J. P. & BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **American Society for Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002(a).
- LACHAUD, L., CHABBERT, E., DUBESSAY, P., DEREURE, J. LAMOTHE, J., DEDET, J. P. & BASTIEN, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v. 125, p. 197-207, 2002(b).
- LAINSON, R., SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, vol. 1, Biology and Epidemiology Petter, W. and Killick-Kendrick, R. (Eds.) Academic Press, 1987.
- LANOTTE, G., RIOUX, J. A., PERIERES, J., VOLLHARDT, Y. Écologie des leishmanioses dans le sud de France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Élaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. **Annales de Parasitologie**, v. 54, p. 277-295, 1979.
- LEÃO, R. N. Q. de (Ed.). **Doenças Infecciosas e parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, p. 631-644, 1997.
- MACHADO, P. R. L., ARAÚJO, M. I. A. S., CARVALHO, L., CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.
- 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. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 82, p. 566–567, 1988.

- MARIN, L. J., CUNHA, A. A., AQUINO, V. H., FIGUEIREDO, L. T. M.
Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semiquantitativa utilizando plasmídeo clonado com parte do gene gB de Citomegalovírus. **Medicina**, v. 35, p. 85-94, 2002.
- MARY, C., FARAUT, F., LASCOMBE, L., DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, 2004.
- MARZOCHI, M. C. A., COUTINHO, S. G., SOUZA, W. J., AMENDOEIRA, M. R.
Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.
- 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–Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.
- MATHIS, A., DEPLAZES, P. PCR and cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1145-1149, 1995.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral**. Brasília, 120p.
- 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*. **Transactions Real Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 88, p. 491-493, 1994.

- NABORS, G. S., FARRELL, J. P. Successful chemotherapy in experimental leishmaniasis is influenced by the polarity of the T cell response before treatment. **Journal of Infectious Diseases**, vol. 173, n. 4, p. 979-986, 1996.
- NICOLAS, L., PRINA, E., LANG, T., MILON, G. Real-Time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1666-1669, 2002.
- OLIVEIRA, G. G. S., SANTORO, F., SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 243-248, 1993.
- PEARSON, R. D., COX, G., JERONIMO, S. M. B., CASCATRANE, J. DREW, J. S., EVANS, T., ALENCAR, J. E. Visceral Leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, n. 1, p. 8-15, 1992.
- PENNA, H. A. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Brasil Médico**, v. 18, p. 940-950, 1934.
- REBÊLO, J. M. M., MENDES, W. A., COSTA, J. M. L., CAVALEIRO, N. Lista preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia*, França, 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) do Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 12, n.4, p.545-549, 1996.
- REBÊLO, J. M. M., ARAÚJO, J. A. C., CARVALHO, M. L., BARROS, V. L. L., SILVA, F. S., OLIVEIRA, S. T. Flébotomos (Diptera, Phlebotominae) da Ilha de São Luís, zona do Golfão Maranhense, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p.247-252, 1999.
- REALE, S., MAXIA, L., VITALE, F., GLORIOSO, N. S., CARACAPPA, S., VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node

aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, 1999.

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. An Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 112, n. 3-4, p. 102-116, 2006.

REITHINGER, R., LAMBSON, B. E., BARKER, D. C., DAVIES, C. R. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n.2, p. 748-751, 2000.

REITHINGER, R., QUINNELL, R. J., ALEXANDER, B., DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

REITHINGER, R., ESPINOZA, J. C., COURTENAY, O., DAVIES, C. R. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1486-1493, 2003.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. **Molecular cloning a laboratory manual**. 3ed. Vol.1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SHERLOCK, I. A., MIRANDA, J. C., SADIGURSKY, M., GRIMALDI JR, G. Natural infection in the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 515, 1984.

- SILVA, L. A. Perfil imunológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2006. 23f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2006.
- SMYTH, A. J., GHOSH, A., HASSAN, M. Q., BASU, D., BRUIJN, M. H. L., ADHYA, S., MALLIK, K. K., BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and samples of kala-azar patients. **Parasitology**, v. 105, p. 183-192, 1992.
- SOARES, M. R. A. Distribuição de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e infecção natural por *Leishmania chagasi* na Ilha de São Luís-MA, Brasil. 2006. 53 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2006.
- SOLANO-GALEGO, L., MORELL, P., ARBOIX, M., ALBEROLA, J., FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in na area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.
- STRAUSS-AYALI, D. JAFFE, C. L., BURSHTAIN, O., GONEN, L., BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1729 – 1733, 2004.
- SUNDAR, S., RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnost Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.
- TESH, R.B. Control of zoonotic Leishmaniasis: is it time to change strategies? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 3, p. 287-292, 1995.

TRAVI, B. L., JARAMILLO, C. D., MONTOYA, J., SEGURA, I., ZEA, A., GONÇALVES, A., VELLEZ, I. D. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 5, p. 557-565, 1994.

VIEIRA, D. P. 2006. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações – Aula 3: Análise dos produtos: Qualitativa e Semi-Quantitativa. Disponível em: http://www.credsh.ufu.br/documentos/academico/Principios_da_PCR.pdf.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 2002. Visceral leishmaniasis-Disease information. Available from URL: <http://www.who.int/diseases/leish/diseaseinfo.htm>.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha utilizada para cadastro dos cães da área durante as entrevistas domiciliares.

Cadastro

Localidade: Vila Nova	Registro n° :
Endereço:	
Referência:	Fone:
Nome do proprietário:	
Nome do cão:	
Data coleta:	
Material coletado:	volume:
Resultado ELISA: () positivo () negativo obs.:	

Dados

1) Raça:	2) Sexo: (1) Macho (2) Fêmea
3) Idade:	4) Presença de ectoparasitos: (1) Sim (2) Não
5) Pêlo: (1) curto (2) longo	6) Alimentação: (1) Ração (2) Caseira (3) Ração e caseira
7) Convivência com outros animais: (1) Sim (2) Não () cão () gato () galinha outro: _____	8) Regime de criação: (1) Solto (2) Confinado
Observações:	

Entrevistador: _____ Data: ___ / ___ / ___

Responsável Técnico: Ms. Arnaldo Muniz Garcia (Médico Veterinário)

Anexo 2. Descrição do cálculo utilizado para determinar a carga parasitária nas amostras de tecidos.

D.O. alíquota mais diluída = A

D.O. alíquota mais concentrada = B

D.O. da amostra = C

1) $B - A = X$ (intervalo entre a D.O. das bandas-controle);

2) $C - A = Y$ (intervalo entre D.O. da amostra e da alíquota mais diluída);

3) $Y \cdot 100/X = Z$ (proporção da posição da banda no intervalo X);

4) $\log n^{\circ} \text{ parasitas (alíquota mais diluída)} + Z/100 = W$;

5) $\text{antilog } W = n^{\circ} \text{ parasitas na amostra.}$